

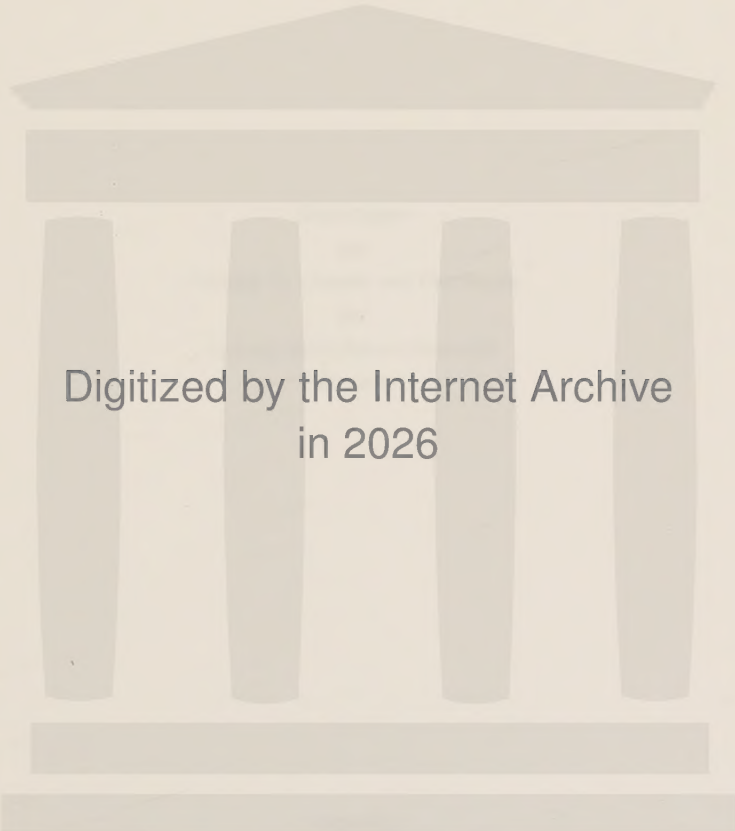
**Immunologisch aktive Polysaccharide aus den
Herbadrogen von *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
und *Arnica montana* L. sowie aus
Arnica montana L. Zellkulturen**

Jörg Puhlmann

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0001

**IMMUNOLOGISCH AKTIVE POLYSACCHARIDE AUS DEN HERBADROGEN VON
ACHYROCLINE SATUREIOIDES (LAM.) DC. UND ARNICA MONTANA L.
SOWIE AUS ARNICA MONTANA L. ZELLKULTUREN**

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Jörg Puhlmann
aus
München

Juni 1989

1. Berichtersteller: Prof. Dr. H. Wagner
 2. Berichtersteller: Prof. Dr. M. H. Zenk
- Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1989

Leistungsbeurteilung

Prüfungsausschuss		Prüfungsausschuss
1.1	Prüfungsausschuss	1.1
1.2	Prüfungsausschuss	1.2
1.3	Prüfungsausschuss	1.3
1.4	Prüfungsausschuss	1.4
1.5	Prüfungsausschuss	1.5
1.6	Prüfungsausschuss	1.6
1.7	Prüfungsausschuss	1.7
1.8	Prüfungsausschuss	1.8
1.9	Prüfungsausschuss	1.9
1.10	Prüfungsausschuss	1.10
1.11	Prüfungsausschuss	1.11
1.12	Prüfungsausschuss	1.12
1.13	Prüfungsausschuss	1.13
1.14	Prüfungsausschuss	1.14
1.15	Prüfungsausschuss	1.15
1.16	Prüfungsausschuss	1.16
1.17	Prüfungsausschuss	1.17
1.18	Prüfungsausschuss	1.18
1.19	Prüfungsausschuss	1.19
1.20	Prüfungsausschuss	1.20
1.21	Prüfungsausschuss	1.21
1.22	Prüfungsausschuss	1.22
1.23	Prüfungsausschuss	1.23
1.24	Prüfungsausschuss	1.24
1.25	Prüfungsausschuss	1.25
1.26	Prüfungsausschuss	1.26
1.27	Prüfungsausschuss	1.27
1.28	Prüfungsausschuss	1.28
1.29	Prüfungsausschuss	1.29
1.30	Prüfungsausschuss	1.30
1.31	Prüfungsausschuss	1.31
1.32	Prüfungsausschuss	1.32
1.33	Prüfungsausschuss	1.33
1.34	Prüfungsausschuss	1.34
1.35	Prüfungsausschuss	1.35
1.36	Prüfungsausschuss	1.36
1.37	Prüfungsausschuss	1.37
1.38	Prüfungsausschuss	1.38
1.39	Prüfungsausschuss	1.39
1.40	Prüfungsausschuss	1.40
1.41	Prüfungsausschuss	1.41
1.42	Prüfungsausschuss	1.42
1.43	Prüfungsausschuss	1.43
1.44	Prüfungsausschuss	1.44
1.45	Prüfungsausschuss	1.45
1.46	Prüfungsausschuss	1.46
1.47	Prüfungsausschuss	1.47
1.48	Prüfungsausschuss	1.48
1.49	Prüfungsausschuss	1.49
1.50	Prüfungsausschuss	1.50
1.51	Prüfungsausschuss	1.51
1.52	Prüfungsausschuss	1.52
1.53	Prüfungsausschuss	1.53
1.54	Prüfungsausschuss	1.54
1.55	Prüfungsausschuss	1.55
1.56	Prüfungsausschuss	1.56
1.57	Prüfungsausschuss	1.57
1.58	Prüfungsausschuss	1.58
1.59	Prüfungsausschuss	1.59
1.60	Prüfungsausschuss	1.60
1.61	Prüfungsausschuss	1.61
1.62	Prüfungsausschuss	1.62
1.63	Prüfungsausschuss	1.63
1.64	Prüfungsausschuss	1.64
1.65	Prüfungsausschuss	1.65
1.66	Prüfungsausschuss	1.66
1.67	Prüfungsausschuss	1.67
1.68	Prüfungsausschuss	1.68
1.69	Prüfungsausschuss	1.69
1.70	Prüfungsausschuss	1.70
1.71	Prüfungsausschuss	1.71
1.72	Prüfungsausschuss	1.72
1.73	Prüfungsausschuss	1.73
1.74	Prüfungsausschuss	1.74
1.75	Prüfungsausschuss	1.75
1.76	Prüfungsausschuss	1.76
1.77	Prüfungsausschuss	1.77
1.78	Prüfungsausschuss	1.78
1.79	Prüfungsausschuss	1.79
1.80	Prüfungsausschuss	1.80
1.81	Prüfungsausschuss	1.81
1.82	Prüfungsausschuss	1.82
1.83	Prüfungsausschuss	1.83
1.84	Prüfungsausschuss	1.84
1.85	Prüfungsausschuss	1.85
1.86	Prüfungsausschuss	1.86
1.87	Prüfungsausschuss	1.87
1.88	Prüfungsausschuss	1.88
1.89	Prüfungsausschuss	1.89
1.90	Prüfungsausschuss	1.90
1.91	Prüfungsausschuss	1.91
1.92	Prüfungsausschuss	1.92
1.93	Prüfungsausschuss	1.93
1.94	Prüfungsausschuss	1.94
1.95	Prüfungsausschuss	1.95
1.96	Prüfungsausschuss	1.96
1.97	Prüfungsausschuss	1.97
1.98	Prüfungsausschuss	1.98
1.99	Prüfungsausschuss	1.99
2.00	Prüfungsausschuss	2.00

Für meine Mutter
Für meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. POLYSACCHARIDE AUS ACHYROCLINE SATUREIODES (LAM.) DC. HERBA	2
1. Kenntnisstand	2
1.1. Systematik und Verbreitung	2
1.2. Botanische Beschreibung	3
1.3. Volksmedizinische Verwendung	4
1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	5
1.5. Bisherige pharmakologische Untersuchungen	5
2. Eigene Untersuchungen	7
2.1. Isolierung und Fraktionierung von Rohpolysaccharidfraktionen	7
2.2. Darstellung der Einzelkomponente AS 1 aus der 1 + 0,5 Fällung	10
2.2.1. Anionenaustauschchromatographie	10
2.2.2. Gelfiltrationschromatographie	11
2.3. Darstellung der Einzelkomponenten AS 3 und AS 4 aus dem Wasserextrakt	12
2.3.1. Anionenaustauschchromatographie	12
2.3.2. Gelchromatographie	14
2.4. Prüfung der Polysaccharide AS 1, AS 3 und AS 4 auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung	15
2.4.1. HP-GPC-Chromatographie	15
2.4.2. Molekulargewichtsbestimmung	16
2.5. Strukturaufklärung der Polysaccharide AS 3 und AS 4	17
2.5.1. Allgemeine Parameter	17
2.5.2. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse	17
2.5.3. Pektinaseabbau	19
2.5.4. Bestimmung des Veresterungsgrades	19
2.5.5. ¹³ C-NMR-Spektroskopie	20

2.5.6.	Beeinflussung der ^{13}C -NMR-Spektroskopie durch ferro- und paramagnetische Ionen	21
2.5.7.	Methylierungsanalyse	23
2.5.8.	Reduktion der Galakturonsäure	26
2.5.9.	Methylierungsanalyse der reduzierten Polysaccharide AS 3R und AS 4R	26
2.5.10.	Partialhydrolyse der reduzierten Polysaccharide AS 3R und AS 4R	30
2.5.11.	Methylierungsanalyse der Partialhydrolysate AS 3RP und AS 4RP	31
2.5.12.	Strukturvorschläge für die Polysaccharide AS 3 und AS 4	34
2.6.	Partielle Charakterisierung des Polysaccharides AS 1	36
2.6.1.	Zuckeranalyse	36
2.6.2.	Methylierungsanalyse von AS 1	36
2.7.	Vergleiche der isolierten Polysaccharide AS 1, AS 3 und AS 4 mit Polysacchariden der Literatur	39
C.	POLYSACCHARIDE AUS ARNICA MONTANA L. HERBA	41
1.	Kenntnisstand	41
1.1.	Systematik und Verbreitung	41
1.2.	Botanische Beschreibung	42
1.3.	Volksmedizinische Verwendung	43
1.4.	Bisher bekannte Inhaltsstoffe	45
1.5.	Bisherige pharmakologische Untersuchungen	46
2.	Eigene Untersuchungen	48
2.1.	Identitäts- und Reinheitsuntersuchungen	48
2.2.	Isolierung und Fraktionierung von Rohpolysaccharidfraktionen	48
2.3.	Darstellung der Einzelkomponente AH 1 aus der 1 + 1 Fällung	50
2.3.1.	Anionenaustauschchromatographie	50
2.3.2.	Gelfiltrationschromatographie	52
2.4.	Prüfung von AH 1 auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung	53
2.4.1.	HP-GPC-Chromatographie	53
2.4.2.	Molekulargewichtsbestimmung	53
2.5.	Partielle Charakterisierung des Oligosaccharides AH 1	54
2.5.1.	Optische Drehung	54
2.5.2.	Qualitative und quantitative Zuckeranalyse	54

2.5.3.	Pektinaseabbau	55
2.5.4.	Reduktion der Galakturonsäure	55
2.5.5.	Methylierungsanalyse des reduzierten Oligosaccharides AH 1R	55
2.5.6.	¹³ C-NMR-Spektroskopie von AH 1	58
2.5.7.	Bestimmung des Veresterungsgrades	63
2.6.	Diskussion der chemisch-physikalischen Untersuchungen an einem Oligosaccharid aus <i>Arnica montana</i> L.	63
D.	POLYSACCHARIDE AUS ARNICA MONTANA L. ZELLKULTUREN	65
1.	Produktion nieder- und höhermolekularer Verbindungen durch pflanzliche Zellkulturen	65
2.	Eigene Untersuchungen	67
2.1.	Anlage von <i>Arnica montana</i> L. Zellkulturen	67
2.2.	Isolierung und Fraktionierung von Rohpolysaccharidfraktionen	68
2.3.	Darstellung der Einzelkomponenten A I und A II aus der 1 + 1 Fällung	70
2.3.1.	Anionenaustauschchromatographie	70
2.3.2.	Gelfiltrationschromatographie	71
2.4.	Prüfung der Polysaccharide A I und A II auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung	71
2.4.1.	HP-GPC-Chromatographie	71
2.4.2.	Molekulargewichtsbestimmung	73
2.5.	Partielle Charakterisierung des Polysaccharides A I	75
2.5.1.	Allgemeine Parameter	75
2.5.2.	Qualitative und quantitative Zuckeranalyse	75
2.5.3.	Methylierungsanalyse von Polysaccharid A I	77
2.5.4.	¹³ C-NMR-Spektroskopie des Polysaccharides A I	80
2.5.5.	Ergebnisse der partiellen Charakterisierung des Polysaccharides A I	83
2.6.	Strukturaufklärung des Polysaccharides A II	85
2.6.1.	Allgemeine Parameter	85
2.6.2.	Qualitative und quantitative Zuckeranalyse	85
2.6.3.	Aminosäurebestimmung	87
2.6.4.	Pektinaseabbau	87
2.6.5.	Methylierungsanalyse	88
2.6.6.	¹³ C-NMR-Spektroskopie des Polysaccharides A II	91

2.6.7.	Partialhydrolyse des Polysaccharides A II	97
2.6.8.	Methylierungsanalyse von A IIP	98
2.6.9.	Reduktion der Galakturonsäure	99
2.6.10.	^{13}C -NMR-Spektroskopie des partiellen Hydrolyseproduktes A IIP	102
2.6.11.	Strukturvorschlag für das Polysaccharid A II	104
2.7.	Vergleich der isolierten Polysaccharide A I und A II mit Polysacchariden der Literatur	106

E. UNTERSUCHUNGEN ÜBER STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN VON ECHINACEA-POLYSACCHARIDFRAKTIONEN AUS GROSS- TECHNISCHER PRODUKTION 108

1.	Einführung	108
2.	Entwicklung neuer Aufbereitungsverfahren	109
2.1.	Produktion und Isolierung im Labormaßstab	109
2.2.	Produktion und Isolierung im großtechnischen Maßstab	109
3.	Untersuchungen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen	112
3.1.	Einfluß von Zuckergehalt und -zusammensetzung auf die Wirksamkeit	112
3.2.	^{13}C -NMR-Spektroskopie	116
3.3.	Einfluß der Bindungsverhältnisse und des Verzweigungsgrades auf die TNF-Wirksamkeit	120
3.3.1.	Darstellung des Arabinogalaktans aus Fraktion Mü 14 und dem Chargenpool	120
3.3.2.	Reinigung durch Gelfiltrationschromatographie	121
3.3.3.	Prüfung der Polysaccharide AG _{neu} und BAT 1 auf Homogenität; Molekular- gewichtsbestimmung	121
3.3.4.	Strukturaufklärung der Polysaccharide AG _{neu} und BAT 1	122
3.3.4.1.	Zuckeranalyse	122
3.3.4.2.	Aminosäureanalyse	123
3.3.4.3.	Pektinaseabbau	124
3.3.4.4.	Methylierungsanalyse	124
3.3.4.5.	^{13}C -NMR-Spektroskopie	128
3.3.4.6.	Partialhydrolyse des Polysaccharides BAT 1	133
3.3.4.7.	Methylierungsanalyse von BAT 1P.	134

3.3.4.8.	Reduktion der Galakturonsäure von BAT 1P	135
3.3.4.9.	^{13}C -NMR-Spektroskopie des partiellen Hydrolyseproduktes BAT 1P	138
3.3.4.10.	Strukturvorschlag für das Polysaccharid BAT 1	140
3.3.5.	Diskussion der strukturellen Unterschiede zwischen den nachisolierten Polysacchariden und AG	142
3.4.	Bestimmung des Alkali- und Erdalkaliumgehaltes	143
3.5.	Diskussion der Struktur-Wirkungs-Studien	144
4.	Prüfung der Rohpolysaccharidgemische auf ihre Komponenten- zusammensetzung mit Hilfe der ^{13}C-NMR-Spektroskopie	145
5.	Prüfung auf Kontaminationen mit Lipopolysacchariden	150
5.1.	Kaninchen-Fieber-Test	150
5.2.	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-TEST)	151
5.3.	Versuche zur Endotoxinentfernung durch Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose	152
F.	PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	155
1.	Einleitung	155
2.	Beeinflussung der Phagozytose	156
2.1.	Chemolumineszenz-Test	156
2.2.	Granulozytentest	157
2.3.	Carbon-Clearance-Test	158
3.	Beeinflussung des Komplementsystems	160
3.1.	Antikomplementäre Aktivität im Gesamtkomplementtest	160
3.2.	Nachweis der Aktivierung der Komponente C3 und des Faktors B durch Immunfixation	164
4.	Stimulierung der Lymphozytenproliferation	165
5.	Hemmung des Rattenpfotenödems	168
6.	Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF-α)	171
7.	Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität	176



8.	Diskussion der pharmakologischen Untersuchungen	177
G.	ZUSAMMENFASSUNG	178
H.	EXPERIMENTELLER TEIL	182
1.	Herkunft der Drogen	182
1.1.	Achyrocline satureioides (Lam.) DC.	182
1.2.	Arnica montana L.	182
1.3.	Arnica montana L. Zellkulturen	182
1.4.	Echinacea purpurea Rohpolysaccharide	182
2.	Allgemeine Arbeitsmethoden	183
2.1.	Physikalisch-chemische Untersuchungen	183
2.1.1.	¹³ C-NMR-Spektroskopie	183
2.1.2.	CHN-Analysen	183
2.1.3.	Polarimetermessungen	183
2.1.4.	Bestimmung der optischen Drehung	184
2.1.5.	Zuckeranalysator	184
2.1.6.	Gaschromatographie	184
2.1.7.	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS-Verfahren).	185
2.2.	HP-GPC-Methode	186
2.3.	Säulenchromatographie	187
2.4.	Dünnschichtchromatographie	188
2.4.1.	Monosaccharide	188
2.4.2.	Flavonoide	189
2.4.3.	Sesquiterpenlactone	189
2.5.	Dialyse	190
2.6.	Uronsäurebestimmung	190
2.6.1.	Nach BITTER und MUIR (1962)	190
2.6.2.	Nach WARDI und Mitarbeiter (1974)	191
2.7.	Proteinbestimmung	192
2.8.	Neutralzuckerbestimmung	192
2.9.	Bestimmung des Veresterungsgrades	192

3.	Spezielle Arbeitsmethoden	194
3.1.	Isolierung der Polysaccharide aus <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	194
3.1.1.	Gewinnung von Rohpolysacchariden aus wässrigem Extrakt	194
3.1.2.	Isolierung der Einzelkomponenten AS 3 und AS 4 aus dem Wassereextrakt	194
3.1.2.1.	Anionenaustauschchromatographie	194
3.1.2.2.	Gelfiltrationschromatographie	195
3.1.3.	Gewinnung von Rohpolysacchariden aus alkalisch-wässrigem Extrakt	196
3.1.4.	Isolierung der Einzelkomponente AS 1 aus der 1 + 0,5 Fällung	197
3.1.4.1.	Anionenaustauschchromatographie	197
3.1.4.2.	Gelfiltrationschromatographie	198
3.2.	Isolierung der Polysaccharide aus <i>Arnicae montanae</i> L. herba	198
3.2.1.	Gewinnung von Rohpolysacchariden aus dem wässrigen Extrakt	198
3.2.2.	Isolierung der Einzelkomponente AH 1 aus der 1 + 1 Fällung	199
3.2.2.1.	Anionenaustauschchromatographie	199
3.2.2.2.	Gelfiltrationschromatographie	199
3.3.	Isolierung der Polysaccharide aus dem Zellkulturmährmedium von <i>Arnica montana</i> L.	200
3.3.1.	Isolierung der Einzelkomponenten A I und A II aus der 1 + 1 Fällung	201
3.3.1.1.	Anionenaustauschchromatographie	201
3.3.1.2.	Gelfiltrationschromatographie	201
3.4.	Isolierung der Polysaccharide aus Rohpolysaccharidfraktionen groß-technischer Herkunft	203
3.4.1.	Isolierung der Einzelkomponente AG _{neu} aus der Fraktion Mü 14	203
3.4.1.1.	Anionenaustauschchromatographie	203
3.4.1.2.	Gelfiltrationschromatographie	203
3.4.2.	Isolierung der Einzelkomponente BAT 1 aus dem Chargenpool	204
3.4.2.1.	Anionenaustauschchromatographie	204
3.4.2.2.	Gelfiltrationschromatographie	204
3.5.	Molekulargewichtsbestimmung (M_w) mit HP-Gelpermeationschromatographie	205
3.6.	Versuche zur Endotoxinabtrennung durch Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose	206
3.7.	Acetylierung von Polysacchariden	207
3.8.	Darstellung der methylierten Alditolacetate	208
3.9.	Hydrolysebedingungen	209
3.9.1.	Methode A	209

3.9.2.	Methode B (Quantitative Neutralzuckerbestimmung)	209
3.10.	Darstellung der Alditolacetate	209
3.10.1.	Methode A	209
3.10.2.	Methode B	210
3.11.	Enzymatische Hydrolyse mit Pektinase	210
3.12.	Partialhydrolyse	211
3.13.	Reduktion der Uronsäuren	211
3.13.1.	Methode nach TAYLOR und CONRAD (1972)	211
3.13.2.	Methode nach UKAI und Mitarbeiter (1977)	212
4.	Pharmakologische Methoden	213
4.1.	Chemilumineszenz-Test	213
4.2.	Granulozytentest	214
4.3.	Carbon-Clearance-Test	215
4.4.	Hämolytische Testsysteme zur Bestimmung der Gesamtkomplement-aktivität	216
4.4.1.	Klassischer Weg (CP 2)	216
4.4.2.	Alternativer Weg (AP 2)	217
4.5.	Immunfixation	217
4.5.1.	Immunfixation für die Komponente C3	217
4.5.2.	Immunfixation für den Faktor B	219
4.6.	Lymphozytentransformationstest	219
4.7.	Hemmung des Rattenpfotenödems	220
4.8.	Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF- α)	220
4.9.	Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität	221
I.	LITERATUR	222

A. EINLEITUNG

Frühere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis haben gezeigt, daß verschiedene Vertreter der Asteraceen-Familie immunstimulierend wirkende Polysaccharide enthalten. Besonders stark stimulierende Eigenschaften gegenüber humanen Granulozyten und Makrophagen wiesen dabei Polysaccharide aus Echinacea-Arten, *Eupatorium perfoliatum*, *Calendula officinalis* und *Chamomilla recutita* auf. Diese Pflanzen finden seit langem bei der Herstellung von Phytopräparaten mit dem Indikationsanspruch der "unspezifischen Abwehrsteigerung" Verwendung.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, Polysaccharide von weiteren Vertretern der Asteraceen-Familie auf immunstimulierende Aktivität zu prüfen. Zu diesem Zweck sollten die Polysaccharide aus *Arnica montana* L. und *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., der "südamerikanischen Kamille", isoliert, strukturell aufgeklärt und eingehend immunologisch untersucht werden. Die oberirdischen Teile beider Pflanzen zählen zu den in der Volksmedizin am häufigsten gegen verschiedene entzündliche Erkrankungen eingesetzten Drogen. Weiterhin sollten vergleichende Untersuchungen der Arnika-Polysaccharide aus Herba-Drogen und Zellkulturen durchgeführt werden.

Da bis heute noch keine Klarheit darüber besteht, an welche Strukturmerkmale die immunstimulierenden Eigenschaften von Polysacchariden aus höheren Pflanzen gebunden sind, stellte ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Suche nach Struktur-Wirkungs-Beziehungen in dieser Stoffklasse dar. Hierzu sollten die früher im Labormaßstab und kürzlich industriell hergestellten Echinacea-Polysaccharide aus Zellkulturen herangezogen werden. Diese Untersuchungen waren auch notwendig, um künftig polysaccharidhaltige Arzneipräparate chemisch und immunologisch standardisieren zu können.

B. POLYSACCHARIDE AUS ACHYROCLINE SATUREIOIDES (LAM.) DC HERBA**1. Kenntnisstand****1.1. Systematik und Verbreitung**

Bei *Achyrocline satureioides* (Lamarck) De Candolle handelt es sich um eine aus Brasilien stammende, jedoch in ganz Südamerika stark verbreitete, einjährige Staude.

Ihre systematische Einteilung lautet wie folgt: Abteilung: Angiospermae, Klasse: Dicotyledonae, Unterklasse: Sympetalae, Ordnung: Asterales, Familie: Asteraceae, Unterfamilie: Tubuliflorae, Tribus: Inuleae, Gattung: *Achyrocline*, Art: *satureioides* (STRASBURGER *et al.* 1978).

Sie muß von ihrer weißen Varietät unterschieden werden und tritt neben ihrer offiziellen Bezeichnung, je nach Landessprache, häufig unter folgenden Synonymen auf:

Tabelle 1: Synonyme für *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Brasilien:	Marcella Macella Macella do campo Alecrim da parede	Argentinien, Uruguay, Kolumbien, Paraguay:	Juan Blanco Marcela Marcela Hembra Marcelita Suso Vira-Vira Yatey-Caa Yerba de Chivo
Peru:	Coronilla Coronilla sachá		
Venezuela:	Birabira Miramira Viravira		

Hinzu kommt, daß einige dieser Synonyme in verschiedenen Ländern auch für andere *Achyrocline*-Arten verwendet werden; so kennzeichnet z.B. Viravira die Arten *A. lehmannii* und *A. tomentosa*, während der Name Marcela ebenfalls für *A. flaccida* gebräuchlich ist.

1.2. Botanische Beschreibung

Das Erscheinungsbild des von März bis April blühenden Krautes von ***Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.** wird geprägt durch ca. 1,5 m hohe, wenig verzweigte Stengel von hellgrüner oder hellgrauer Farbe, deren obere Teile reiche Behaarung aufweisen.

An der Basis ihrer ab dem Mittelteil auftretenden Verzweigungen sitzen gegenständige, häutige Blätter mit lanzettlich, glattrandiger Form. Im Gegensatz zur nur spärlich behaarten, hellgrünen Oberseite schützen viele Deckhaare die gräuliche Unterseite. Bei einer Länge von bis zu 12 cm messen die Blätter an ihrer breitesten Stelle ungefähr 1,5 cm.

Die blaßgelb gefärbten Blüten finden sich in Köpfchen zu rispigen Blütenständen vereinigt. Hierbei stehen meistens 5-6 Blüten zusammen, geschützt von 8-9 schiffchenförmigen, ebenfalls blaßgelben Deckblättern. Die äußeren, weiblichen, fadenförmigen Blüten der Köpfchen treten nur in geringer Zahl auf, wobei der Rand ihrer Korolle Zähnung erkennen läßt. Mit einer Länge von etwa 3 mm entsprechen sie größtmäßig den daneben vorkommenden zwittrigen Zentralblüten. Deren Erscheinungsbild kennzeichnet sie als Röhrenblüten mit fünfblättriger Blumenkrone.

Eine graue Achäne mit fein papillöser Oberfläche bildet die Frucht (SOUZA GROTTA 1964).



Foto 1: *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

1.3. Volksmedizinische Verwendung

Die ethnomedizinischen Angaben über die Verwendung von **Achyrocline satureioides** (Lam.) DC. differieren je nach Land und eingesetztem Drogenteil, so daß sich ein sehr heterogenes Wirkungsspektrum ergibt.

Tabelle 2: Volksmedizinische Verwendung

Land	Drogenteil	Extrakt	eingesetzt:
Argentinien	Blüten	H ₂ O, heiß	als <u>Antiasthmikum</u> , aufgrund <u>regulativer Einflüsse bei der Menstruation</u> (SAGGESE 1959)
Uruguay	n. b.	H ₂ O	als <u>Emmenagogum</u> (GONZALES <i>et al.</i> 1946)
Kolumbien	ganze Pflanze	H ₂ O	bei der <u>Tumorthherapie</u> (GARCIA-BARRIGA 1975)
Paraguay	Kraut	Infus	bei <u>Infektionen</u> (HIRSCHMANN 1984)
Venezuela	ganze Pflanze	H ₂ O, heiß	bei <u>Diabetes</u> (MORTON 1974), als <u>Emmenagogum</u> und <u>Aphrodisiakum</u> (MORTON 1975)
Brasilien	Blütenstände	n. b.	bei Erkrankungen des <u>Gastrointestinaltraktes</u> , als <u>Tonikum</u> , <u>Antidiarrhoikum</u> und <u>Amarum</u> (SIMOES <i>et al.</i> 1988)

n. b.: nicht bekannt

Als Tonikum, Antidiarrhoikum und Amarum finden sich die Blüten auch im Brasilianischen Arzneibuch (DIAS DA SILVA 1929).

Die ROTE LISTE (1989) führt unter dem Begriff Umstimmungsmittel/Immunstimulanzien nur eine Arzneispezialität, Resplant^R, die einen Extrakt aus **Achyrocline satureioides** (Lam.) DC. enthält. Die Einnahme wird bei grippeartigen Erkrankungen, verzögerter Rekonvaleszenz, chronisch entzündlichen Erkrankungen, zur Unterstützung der Antibiotika- und Sulfonamidtherapie sowie zur Grippeprophylaxe empfohlen.

1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Erste Untersuchungen zur Identifizierung von Inhaltsstoffen aus **Achyrocline satureioides** (Lam.) DC. datieren aus den frühen 60er Jahren und beschränken sich auf das Ätherische Öl. Im Wasserdampfdestillat oberirdischer Pflanzenteile ließ sich neben α - und β -Pinen, Limonen und p-Cymol auch Caryophyllen nachweisen (RICCIARDI *et al.* 1963). Spätere Arbeiten ergänzten hier die Verbindungen Cineol (AKISUE 1971) sowie die Sesquiterpene Cadinen, Germacren D und Caryophyllen-1,10-epoxid (HIRSCHMANN 1984).

Zu den aus der Klasse der Flavonoide isolierten Verbindungen zählen neben Isognaphalin (HÄNSEL *et al.* 1971) auch Galangin und Quercetin sowie deren 3-Methyl-ether. Daneben ließen sich andere, zu den Phenylpropanderivaten gehörende Polyphenole wie Kaffeesäure, Caffeoylcalleryanin sowie das Lignanderivat Protocatechuoylcalleryanin (FERRARO *et al.* 1981) identifizieren.

In allerdings sehr geringer Konzentration fand sich ein Kawapyronderivat (KALOGA *et al.* 1983). Von HIRSCHMANN (1984) wurden mit 23-Methyl-6-O-demethylauricepyron und Italipyron ähnlich strukturierte Verbindungen entdeckt.

Die einzigen bisher in den Wurzeln von **Achyrocline satureioides** (Lam.) DC. nachgewiesenen Naturstoffe sind Acetylenverbindungen (BOHLMANN *et al.* 1973).

1.5. Bisherige pharmakologische Untersuchungen

Den vielfältigen, in der Volksmedizin überlieferten Anwendungsgebieten von Extrakten aus **Achyrocline satureioides** (Lam.) DC. stehen nur vereinzelte, wissenschaftlich fundierte Wirk- und Wirksamkeitsnachweise gegenüber.

Ausgehend von dem in Brasilien besonders häufigen Einsatz bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes untersuchten SIMOES und Mitarbeiter Mazerat, Dekokt und alkoholischen Extrakt vor allem auf antiphlogistische, analgetische und spasmolytische Eigenschaften. Gute Wirksamkeit besaßen alle drei Präparationen im Rattenpfotenödemtest. Durch ihre Aktivität im Mäusekrümmungstest erwiesen sich nur die

Wasserextrakte als analgetisch. Spasmolytische Eigenschaften zeigte der alkoholische Extrakt. Diese Ergebnisse wurden, zumindest teilweise, auf die in der Pflanze vorkommenden Flavonoide zurückgeführt, die in den Testsystemen als Kontrollen dienten (SIMOES *et al.* 1988).

Immunstimulierende Eigenschaften fanden erstmals WAGNER und Mitarbeiter für eine Polysaccharid-Rohfraktion. Das aus einem Wasserextrakt gewonnene Rohpolysaccharid stimulierte im in-vitro-Granulozytenausstrichtest die Phagozytose und erhöhte auch in vivo die Carbon-Clearance-Rate des mononuklearphagozytären Systems (WAGNER *et al.* 1985).

2. Eigene Untersuchungen

2.1. **Isolierung und Fraktionierung von Rohpolysaccharidfraktionen**

Die Isolierung der Polysaccharide erfolgte als erstes aus dem wässrigen Extrakt. Dazu mazerierten wir die getrockneten, oberirdischen Teile der Pflanze 24 Stunden mit demineralisiertem Wasser, nachdem wir das getrocknete Pflanzenmaterial zuvor einer erschöpfenden Soxlethextraktion mit Petrolether und Methanol unterworfen hatten. Statt, wie üblich, die Polysaccharide mit organischen Lösungsmitteln zu fällen, konzentrierten wir den Extrakt unter vermindertem Druck auf ein Fünftel seines Volumens und dialysierten ihn 48 Stunden gegen demineralisiertes Wasser mit Cellulosemembranen der nominellen Trenngrenze 10.000 D. Die so erhaltene hochmolekulare Wasserextraktfraktion wurde anschließend gefriergetrocknet.

Da bei diesem Verfahren nur mit sehr geringen Ausbeuten an Hemicellulosen zu rechnen war - Hemicellulosen gehen nur unter alkalischen Bedingungen gut in Lösung (ASPINALL 1980) - und in unserem Arbeitskreis kürzlich immunologisch aktive Vertreter auch aus dieser Stoffklasse isoliert werden konnten (VOLLMAR *et al.* 1986, WAGNER *et al.* 1987), extrahierten wir die Droge anschließend mit 0,5 N Natronlauge. Eine zuvor eingeschobene Na₂EDTA-Mazeration diente der zusätzlichen Reinigung. Nach Ausfällung von Proteinanteilen durch Trichloressigsäure folgte eine fraktionierte Alkoholfällung, die durch Zugabe von 1/2, 1, 2 und 4 Volumenteilen Ethanol vier verschiedene Rohpolysaccharidfraktionen lieferte.

Aufgrund der äußerst geringen Ausbeute des 1 + 4 Fällungsproduktes untersuchten wir diese Fraktion nicht weiter.

Während der Proteingehalt (LOWRY 1951) der Wasserfraktion noch bei 27,7 % lag, zeigten die übrigen Fällungen nur wenig oder keinen Proteinanteil mehr.

Mit Ausnahme des 1 + 2 Fällungsproduktes erwiesen sich alle Fraktionen als in etwa gleich sauer. Lediglich das mit der höchsten Alkoholkonzentration (1 + 4) erhaltene Polysaccharid ergab in beiden Uronsäurebestimmungsmethoden (BITTER *et al.* 1962, WARDI *et al.* 1974) einen um ungefähr ein Drittel geringeren Uronsäuregehalt.

Tabelle 3: Zuckeranalysen und Ausbeuten der Rohpolysaccharidfraktionen

	Wasserextrakt	alkalisch-wässrige Fraktionen			
		1 + 0,5	1 + 1	1 + 2	1 + 4
Molare Zuckerzusammensetzung:					
Rhamnose	0,54	0,30	0,19	0,30	n. b.
Arabinose	0,63	0,39	0,50	1,60	n. b.
Xylose	1,0	1,0	1,0	1,0	n. b.
Mannose	0,23	0,11	0,15	0,41	n. b.
Galaktose	0,93	0,61	0,68	2,07	n. b.
Glucose	0,82	0,50	0,48	1,12	n. b.
Uronsäuregehalt					
nach BITTER u. MUIR (1962):	13,1 %	12,5 %	12,7 %	7,9 %	n. b.
nach WARDI u. Mitarb. (1974):	14,6 %	13,5 %	6,9 %	8,8 %	n. b.
Proteingehalt					
nach LOWRY (1951):	27,7 %	2,2 %	---	2,1 %	n. b.
Ausbeuten*:	1,03 %	0,44 %	0,058 %	0,032 %	0,0008%

n. b.: nicht bestimmt

* bezogen auf die getrocknete Droge

Bei den Neutralzuckern konnten alle üblichen Monosaccharide nachgewiesen werden (BLAKENEY *et al.* 1983). Die molare Verteilung der einzelnen Zucker in den verschiedenen Fraktionen ähnelte sich, wobei in diesem Punkt nur das 1 + 2 Fällungsprodukt deutlich abwich. Anstelle von Xylose fanden wir hier vorwiegend Galaktose und Arabinose.

Die Zusammensetzung der einzelnen Zuckerfraktionen lieferte nur vage Hinweise auf bestimmte, darin enthaltene Strukturtypen von Polysacchariden, obwohl der hohe Xyloseanteil der 1 + 0,5 und der 1 + 1 Fraktion Heteroxylane vermuten ließ. Die Zuckeranalyse des 1 + 2 Rohpolysaccharides deutete auf das Vorliegen von Arabino-galaktanen und der im Vergleich zum Neutralzuckeranteil recht hohe Uronsäuregehalt des Wasserextraktes auf das Vorhandensein pektischer Substanzen hin.

Da durch NaOH-Behandlung extrahierte Hemicellulosen offenbar vorwiegend in den 1 + 0,5 sowie 1 + 1 Fällungen enthalten waren und beide Fällungsprodukte sehr ähnliche Zusammensetzungen aufwiesen, wählten wir zur weiteren Aufarbeitung die in wesentlich höherer Ausbeute vorliegende 1 + 0,5 Fraktion aus.

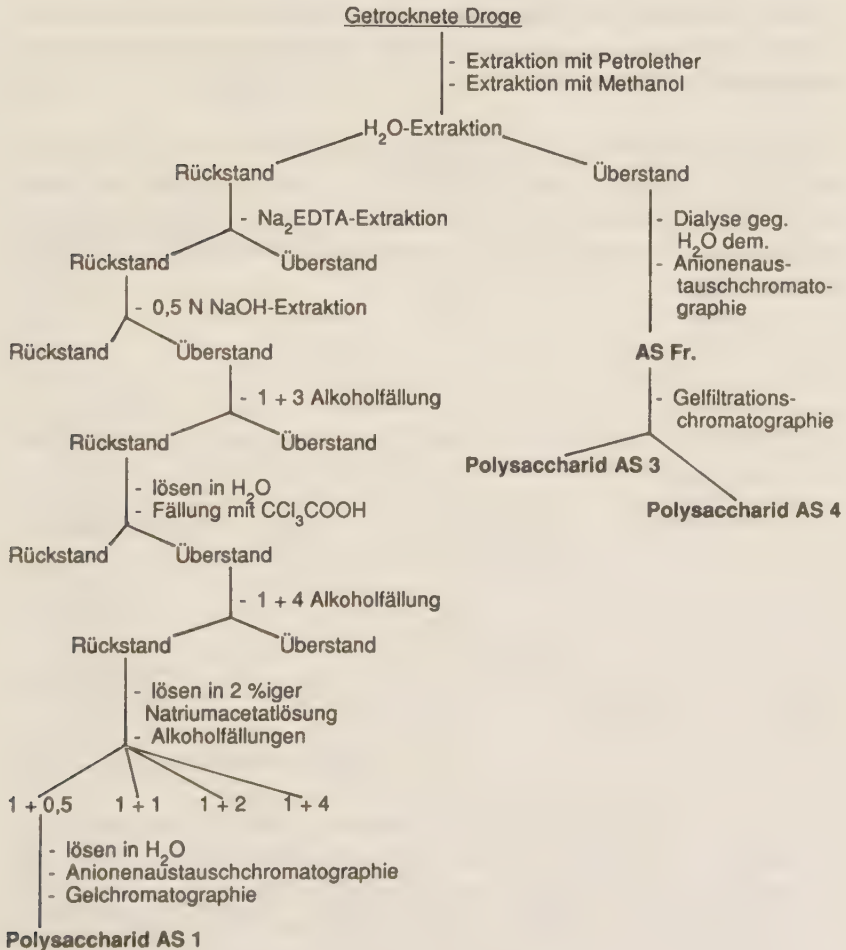


Abb. 1: Isolierungsschema der Polysaccharide AS 1, AS 3 und AS 4 aus *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. herba

2.2. Darstellung der Einzelkomponente AS 1 aus der 1 + 0,5 Fällung

2.2.1. Anionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Reinigung der Hemicellulose-Rohfraktion setzten wir die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B ein, da sich hiermit (O'NEILL *et al.* 1980) auch innerhalb des sauren und neutralen Polymerbereiches Fraktionierungen erzielen lassen.

Bei der Chromatographie der 1 + 0,5 Fällung an der in der Acetatform vorliegenden Säule konnte mit Wasser keine Abtrennung von neutralen Substanzen erreicht werden. Erst mit einem 0 - 1 M NaCl-Gradienten wurden bei Salzkonzentrationen von ca. 0,05 - 0,15 M bzw. 0,25 - 0,4 M NaCl zwei relativ homogen erscheinende Fraktionen eluiert.

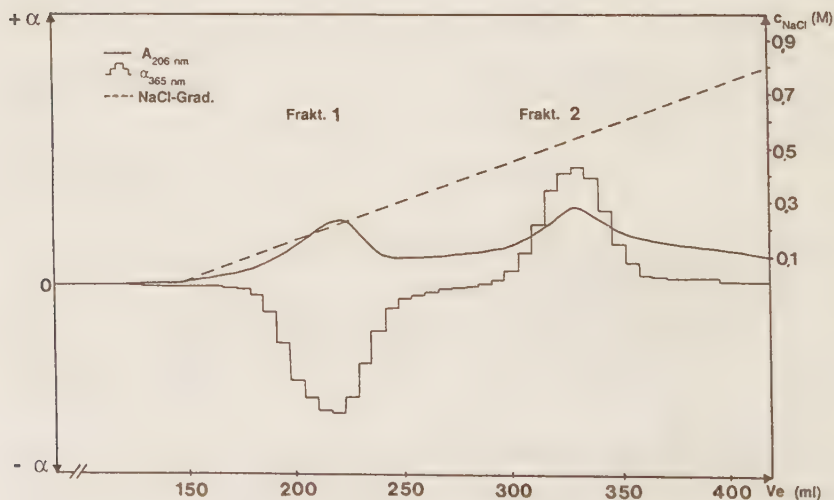


Abb. 2: Anionenaustauschchromatographie der 1 + 0,5 Fällung

Die schwächer saure Fraktion 1 mit negativer optischer Aktivität stellte bereits ein relativ hochgereinigtes Xylan dar, bei dem nur noch in sehr geringen Mengen andere Neutralzucker nachweisbar waren. Demgegenüber zeigte die rechtsdrehende Fraktion 2 eine Zusammensetzung aus Rhamnose, Arabinose, Xylose und Galaktose im Verhältnis 1 : 0,85 : 2,5 : 1. Nachdem sich die beiden Fraktionen zueinander mengenmäßig wie 3 : 1 verhielten, wurde die Fraktion 1 weiter aufgearbeitet.

Tabelle 4: Zuckeranalysen und Ausbeuten der Anionenaustauscherfraktionen der 1 + 0,5 Fällung

	Fraktion 1	Fraktion 2
Molare Zuckerzusammensetzung:		
Rhamnose	Spuren	0,42
Arabinose	0,03	0,36
Xylose	1,0	1,0
Galaktose	---	0,43
Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962):		
	7,5 %	20,9 %
Proteingehalt nach LOWRY (1951):		
	---	---
Ausbeuten*:		
	35,2 %	11,7 %

---: kein Gehalt

* bezogen auf die 1 + 0,5 Fällung

2.2.2. Gelfiltrationschromatographie

Die Durchführung der Gelchromatographie erfolgte an Sephacryl S-400 superfine mit 0,2 N NaCl-Lösung als Eluens. Es gelang unter diesen Bedingungen, Fraktion 1 als symmetrischen Peak über UV- und Refraktometerdetektion sowie Messung der optischen Aktivität zu erhalten und von höhermolekularen Begleitsubstanzen im Ausschlußvolumen der Säule abzutrennen. Die Überprüfung der Einheitlichkeit des Polysaccharides **AS 1** fand anschließend mit Hilfe eines HP-GPC-Systems statt, siehe Abschnitt B.3.4.1..

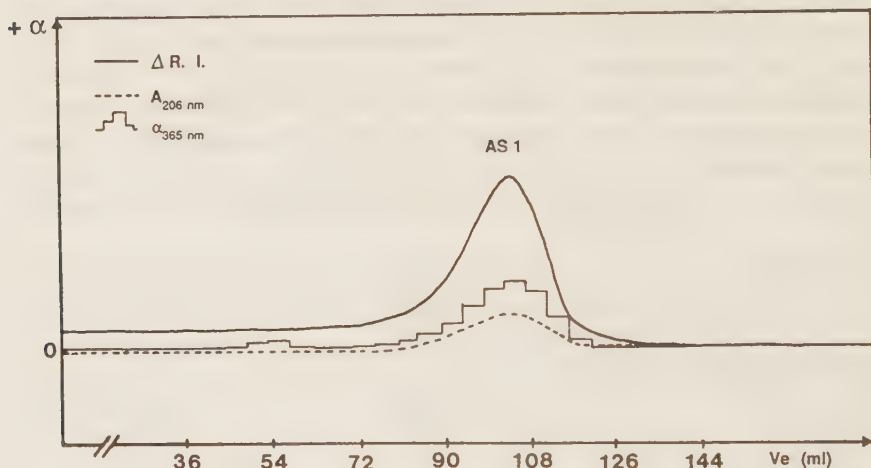


Abb. 3: Gelfiltration von Fraktion 1 an Sephacryl S-400 superfine

2.3. Darstellung der Einzelkomponenten AS 3 und AS 4 aus dem Wasserextrakt

2.3.1. Anionenaustauschchromatographie

Zur ersten Aufreinigung des Wasserextraktes wählten wir entsprechend der nachgewiesenen sauren Bestandteile wiederum die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose CL-6B.

Die Elution mit destilliertem Wasser führte zwar zur Ablösung einer neutralen Fraktion, der größte Teil des Ausgangsextraktes verblieb jedoch weiterhin auf dem Anionenaustauschermaterial. Zwei zusätzliche, saure Fraktionen erhielten wir erst nach Elution mit einem linearen Kochsalzgradienten. Negative optische Aktivität besaß eine bei einer NaCl-Konzentration von 0,03 - 0,21 M gewonnene Verbindung. Die Abtrennung einer positiv drehenden Fraktion erfolgte anschließend mit einer Kochsalzkonzentration von 0,24 - 0,42 M.

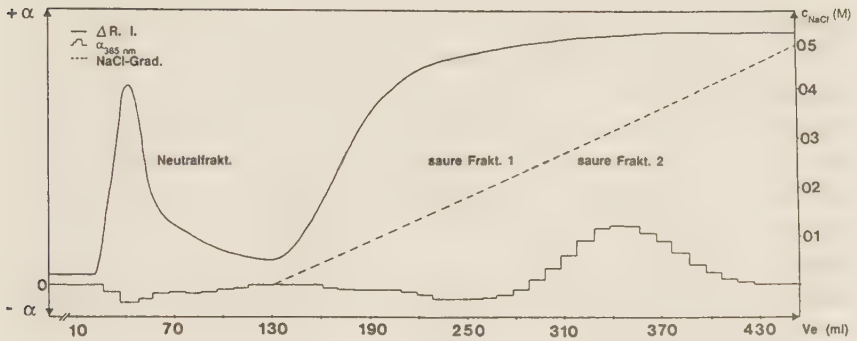


Abb. 4: Anionenaustauschchromatographie des Wasserextraktes

Die einzelnen Fraktionen waren sehr unterschiedlich zusammengesetzt. Die Neutralfraktion bestand zu annähernd gleichen Anteilen aus Arabinose, Galaktose und Glucose. Der in dieser Fraktion unerwartet hohe Uronsäuregehalt dürfte auf Verunreinigungen durch am Ionenaustauscher nicht gebundene Begleitsubstanzen zurückzuführen sein, die im Carbazoltest falschpositive Ergebnisse lieferten. Fraktion 1 charakterisierte ein hoher Xyloseanteil, Fraktion 2 ein hoher Uronsäureanteil.

Die Ausbeuten der drei erhaltenen Fraktionen fielen sehr gering aus. Da vor der Ionenaustauschchromatographie keine alkoholischen Fällungen durchgeführt wurden, war dies zu erwarten.

Nachdem Fraktion 1 offensichtlich wieder ein Heteroxylyan enthielt, wie wir es bereits aus der 1 + 0,5 Fällung isolieren konnten, die Neutralfraktion aber nur in sehr geringer Ausbeute vorlag, führten wir die weitere Aufarbeitung mit Fraktion 2 fort.

Tabelle 5: Zuckeranalysen und Ausbeuten der Anionenaustauscherfraktionen des Wassereextraktes

	Neutralfrakt.	saure Frakt. 1	saure Frakt. 2
Molare Zuckerzusammensetzung:			
Rhamnose	Spuren	0,16	1,36
Arabinose	1,07	0,70	0,54
Xylose	0,45	4,88	0,36
Mannose	0,34	0,20	0,19
Galaktose	1,0	1,0	1,0
Glucose	1,16	0,54	0,43
Uronsäuregehalt			
nach BITTER u. MUIR (1962):	14,7 %	12,7 %	42,6 %
Proteingehalt			
nach LOWRY (1951):	1,6 %	2,75 %	4,65 %
Ausbeuten*:			
	3,4 %	8,5 %	10,5 %

* bezogen auf den Wassereextrakt

2.3.2. Gelchromatographie

Vorversuche an Sephacryl S-400 HR demonstrierten die Inhomogenität von Fraktion 2. Aufgrund seines großen Fraktionierungsbereiches eignete sich dieses Gelmaterial jedoch nicht für eine Weiterreinigung. Eine anschließend zur Abtrennung niedermolekularer Begleitsubstanzen durchgeführte Chromatographie an Ultrogel AcA 202 erwies sich als überflüssig; Teile der Substanzmischung wurden allerdings im Fraktionierungsbereich der Säule eluiert. Wir versuchten daher, Fraktion 2 über Fraktogel TSK HW-50 (S) mit einem, im Vergleich zu Ultrogel AcA 202 etwas erweiterten Fraktionierungsbereich von 500 D bis 20.000 D zu trennen. Die erhaltenen zwei Fraktionen rechromatographierten wir anschließend an demselben Gel und prüften **AS 3** und **AS 4** dann in einem HP-GPC-System auf Einheitlichkeit.

2.4. Prüfung der Polysaccharide AS 1, AS 3 und AS 4 auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung

2.4.1. HP-GPC-Chromatographie

Die Homogenität der isolierten Verbindungen überprüften wir mit der HP-GPC Methode (High Pressure Gel Permeation Chromatography). Um Interaktionen mit dem Gelmaterial auszuschließen, kam ein Puffersystem mit einer Molkonzentration von 0,2 zum Einsatz. Die unter den angegebenen Bedingungen erhaltenen Elutionsprofile der drei Polysaccharide zeigten relativ symmetrische Peaks, so daß AS 1, AS 3 und AS 4 als chemisch einheitliche Verbindungen betrachtet werden konnten.

Abb. 5: HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides AS 1

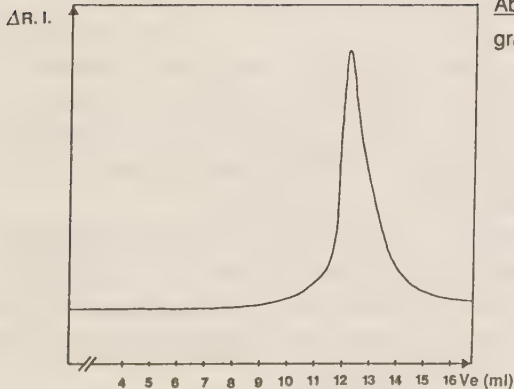
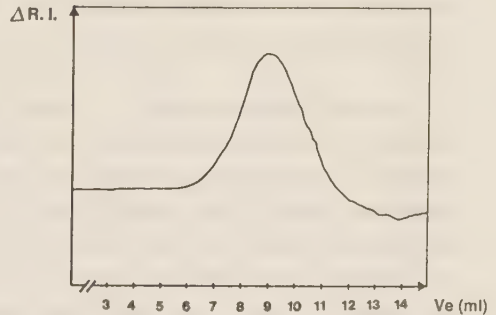
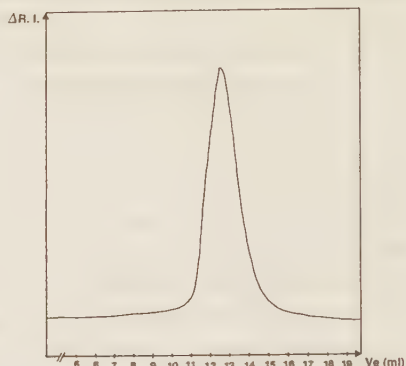


Abb. 6: HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides AS 3

Abb. 7: HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides AS 4



2.4.2. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der drei Verbindungen wurden ebenfalls durch HP-Gelpermeationschromatographie ermittelt.

Um optimale Fraktionierungsbereiche zu erhalten, setzten wir verschiedene Kombinationen der nach steigendem Ausschlußvolumen in Reihe geschalteten Säulen Porasil 60, Bondagel E-125 und Bondagel E-500 ein. Diese Kombinationen führten zu Trennbereichen, die zwischen 2.000 D und 500.000 D bei AS 1, zwischen 100 D und 10.000 D bei AS 3 und zwischen 100 D bis 50.000 D bei AS 4 lagen. Anschließend eichten wir die einzelnen Systeme mit den Dextranen 10 T, 40 T, 70 T, 110 T, 500 T, 2.000 T und Glucose bei AS 1, mit Maltotriose, Maltoheptaose, Dextransulfat 5.000, den Dextranen 10 T, 40 T und Glucose bei AS 3 und equilibrierten bei AS 4 mit Glucose und den Dextranen 10 T, 40 T, 70 T und 110 T.

Tabelle 6: Molekulargewichtsbestimmung der Polysaccharide AS 1*, AS 3** und AS 4***

Säulensysteme:	* μ -Bondagel E-125 + μ -Bondagel E-500
	** μ -Porasil GPC 60
	*** μ -Porasil GPC 60 + μ -Bondagel E-125

Puffersystem: 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,0

AS 1	M_w 43.000 D
AS 3	M_w 7.600 D
AS 4	M_w 15.000 D

2.5. Strukturaufklärung der Polysaccharide AS 3 und AS 4

2.5.1. Allgemeine Parameter

Beide Polysaccharide riefen eine Rechtsdrehung hervor, wobei AS 3 eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = + 71,6^\circ$ und AS 4 von $[\alpha]_D^{20} = + 77,3^\circ$ zeigte (DAB 9).

In beiden Polysacchariden ließ sich bei der Elementaranalyse kein Stickstoff nachweisen, so daß nennenswerte Aminosucker- und Proteinanteile bei AS 3 und AS 4 ausgeschlossen werden konnten.

Tabelle 7: Elementaranalyse der Polysaccharide AS 3 und AS 4

	C (%)	H (%)	N (%)
AS 3	35,35	5,86	---
AS 4	36,22	5,89	---

2.5.2. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

Die qualitative Bestimmung der Zuckerzusammensetzung erfolgte nach 90 minütiger Totalhydrolyse mit 2 N Trifluoressigsäure bei 121°C mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. AS 3 und AS 4 zeigten eine sehr ähnliche Zusammensetzung, wobei sich neben Galakturonsäure in beiden Verbindungen auch Rhamnose, Galaktose, Arabinose und Xylose erkennen ließen.

Nach Überführung der Zucker in die Alditolacetatform ermittelten wir deren molare Verhältnisse mit Hilfe der Gaschromatographie. Rhamnose und Arabinose lagen bei beiden Polysacchariden in gleichen Anteilen vor. Im Unterschied zu AS 3 wies AS 4 jedoch einen dreimal höheren Gehalt an Xylose und doppelt soviel Galaktose auf.

Die durch die Elementaranalyse bereits festgestellte Proteinfreiheit bestätigte eine Bestimmung nach LOWRY.

Beide Polysaccharide erzielten bei der Ermittlung des Uronsäuregehaltes mit ca. 66 % sehr hohe Werte. Diese Ergebnisse sprachen für das Vorliegen von pektinartigen Strukturen.

Tabelle 8: Zuckeranalysen der Polysaccharide AS 3 und AS 4

	AS 3	AS 4
Molare Zuckerzusammensetzung:		
Rhamnose	1,02	1,08
Arabinose	1,0	1,0
Xylose	0,31	1,09
Galaktose	0,83	1,64
Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962):		
	65,1 %	66,4 %
Proteingehalt nach LOWRY (1951):		
	0,6 %	0,4 %

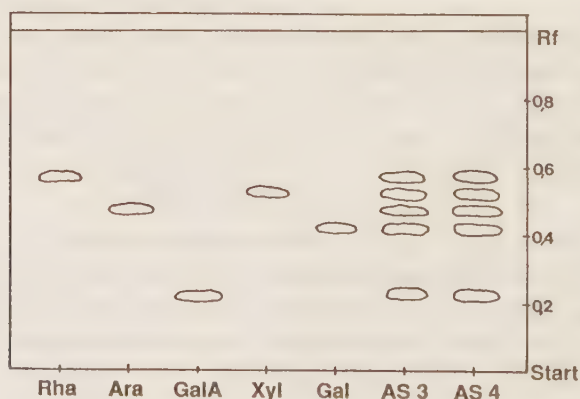


Abb. 8:

DC der Totalhydrolysate der Polysaccharide AS 3 und AS 4

2.5.3. Pektinaseabbau

Pektine enthalten in der Regel (1→4)- α -verknüpfte Galakturonsäureeinheiten, die teilweise mit Methanol verestert vorliegen. Mit Hilfe von Pektinase lassen sich unveresterte, in dieser Bindungsart vorliegende Polygalakturonate bis zur Stufe der monomeren Galakturonsäure hydrolysieren.

Um den möglicherweise hohen Veresterungsgrad von AS 3 und AS 4 herabzusetzen, führten wir eine basische Esterhydrolyse durch und depolymerisierten anschließend die Polysaccharide mit dem Enzym (COLLINS *et al.* 1981a). Nach dünnstschichtchromatographischer Auftrennung der Abbauprodukte zeigte sich in Höhe des Galakturonsäurevergleichs bei beiden Polysacchariden eine kräftige Zone, die als deutlicher Hinweis auf das Vorliegen dieses sauren Zuckers in oben erwähnter Bindungsart gelten kann.

2.5.4. Bestimmung des Veresterungsgrades

Zur Ermittlung des genauen Veresterungsgrades eines Pektins finden sich in der Literatur in erster Linie zwei Verfahren. Beiden Methoden gemeinsam ist eine alkalische Esterspaltung. Im ersten Fall wird das freigesetzte Methanol direkt über HPLC bestimmt (VORAGEN *et al.* 1986), während sich die Bestimmung nach WOOD und Mitarbeiter auf die sogenannte Hantzsch-Synthese zur Darstellung substituierter Pyridine stützt. Das freigesetzte Methanol erfährt durch Kaliumpermanganatlösung eine Oxidation zum Formaldehyd, der in Anwesenheit von Pentan-2,4-dion und Ammoniak zu einem farbigen, spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 412 nm erfaßbaren 1,4-Dihydropyridinderivat weiterreagiert (WOOD *et al.* 1971).

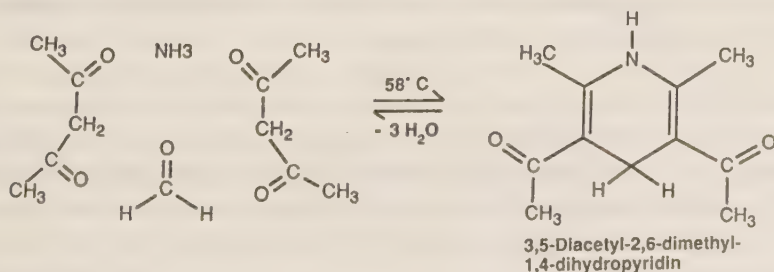


Abb. 9: Reaktionsverlauf der Methanol-Bestimmung

Wir entschieden uns für die zweite Methode und überprüften ihre Reproduzierbarkeit mit einem im Handel erhältlichen Citrus-Pektin (Fa. Sigma) bekannten Veresterungsgrades. Dessen Galakturonsäuregehalt liegt nach Angaben der Herstellerfirma bei ca. 85 %. Der Methoxylgehalt beträgt etwa 9,5 %.

Die von uns erhaltenen Daten stimmten bei drei Bestimmungen mit einem Durchschnittswert von 9,58 % Methoxylgehalt sehr gut mit diesem Wert überein.

Für die Polysaccharide AS 3 und AS 4 ergab sich nach dieser Methode ein Methoxylgehalt von 5,1 % bzw. 4,3 %. Aus diesem errechnet sich, bezogen auf den jeweiligen Galakturonsäuregehalt, ein Veresterungsgrad von 48,1 % bzw. 39,7 % mit Methanol.

Tabelle 9: Veresterungsgrad der Polysaccharide AS 3 und AS 4

	% MeO	% GalA verestert
AS 3	5,1	48,1
AS 4	4,3	39,7

2.5.5. ¹³C-NMR-Spektroskopie

Trotz mehrfacher Versuche ließen sich für die Polysaccharide AS 3 und AS 4 keine interpretierbaren ¹³C-NMR-Spektren aufnehmen. Mit Ausnahme des als interner Standard dienenden Methanolsignals bei 48,999 ppm hoben sich alle anderen Signale nicht oder nur unwesentlich vom Grundrauschen ab. Eine Temperaturerhöhung auf 50° C führte zu keiner verbesserten Auflösung.

Eine mögliche Erklärung könnte im Vorliegen komplex gebundener paramagnetischer Elemente zu suchen sein, die bei der Kernresonanzspektroskopie störende Einflüsse ausüben. Um unsere Vermutung zu bestätigen, analysierten wir die Polysaccharide AS 3 und AS 4 mit der plasmaangeregten Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES)*.

*ICP-AES: "induction-coupled plasma atomic emission spectrometry" zur Bestimmung anorganischer Elemente

2.5.6. Beeinflussung der ^{13}C -NMR-Spektroskopie durch ferro- und paramagnetische Ionen

Ferro- und paramagnetische Ionen verkürzen bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie die Relaxationszeiten und führen so zu stark verbreiterten Linien, die unter Umständen keine exakte Interpretation der Signale mehr zulassen (FRIEBOLIN *et al.* 1988). Wir untersuchten daher mit der plasmaangeregten Atomemissionsspektroskopie die Polysaccharide AS 3 und AS 4 auf ihren Gehalt an Mangan, sowie den paramagnetischen Elementen Eisen, Nickel und Kobalt und erhielten die in Tabelle 10 wiedergegebenen Ergebnisse.

Tabelle 10: Ionengehalt der Polysaccharide AS 3 und AS 4 sowie eines Echinacea-Polysaccharidgemisches aus großtechnischer Produktion*

	AS 3 mg/kg	AS 4 mg/kg	CH-P N/CH-P 2N 1 : 1
Mangan	8,4	26	1
Eisen	214	536	34
Nickel	85	170	<26
Kobalt	40	493	<14
Zink	255	772	50

Danach enthalten sowohl AS 3 als auch AS 4 vor allem größere Mengen des Elementes Eisen. Um zu prüfen, ob und inwieweit die gefundenen Ionen die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren beeinflussen, setzten wir einem Echinacea-Polysaccharidgemisch bekannter Zusammensetzung, von dem zuvor ein einwandfreies Spektrum erhalten werden konnte, entsprechende Mengen der Chloride der oben genannten Elemente zu.

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, wirkte sich die jetzt erhöhte Menge an paramagnetischen Ionen äußerst negativ auf die Signalintensität aus, so daß lediglich ein Spektrum mit sehr schlecht aufgelösten Resonanzen erhalten werden konnte. Dies

* Die quantitative Bestimmung der Ionen mit der ICP-AES wurde im Mikroanalytischen Labor Pascher, Remagen, durchgeführt.

bewies, daß die in AS 3 und AS 4 enthaltenen ferro- und paramagnetischen Ionen zumindest teilweise die Aufnahme interpretierbarer Kernresonanzspektren dieser Polysaccharide verhinderten.

Hinweise auf eine besondere Fähigkeit der Pflanze *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. zur Eisenspeicherung fanden sich nicht. Ob unsere Drogenchargen von Pflanzen stammen, die zufällig auf besonders sauren und damit oft auch eisenreichen Böden wuchsen (RUHLAND *et al.* 1958), oder aber der Norm entsprechen, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

Eine Beeinflussung von Enzymsystemen, speziell dem Komplementsystem durch Schwermetalle wurde bisher nur für Zink beschrieben (ASGHAR 1984). Es inhibiert den klassischen Weg der Komplementkaskade in einem Konzentrationsbereich bis zu $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Der in AS 3 und AS 4 ermittelte Gehalt an diesem Element lag jedoch erheblich unter dieser Grenzkonzentration (bezogen auf das verwendete Testsystem, siehe F.3.1.).

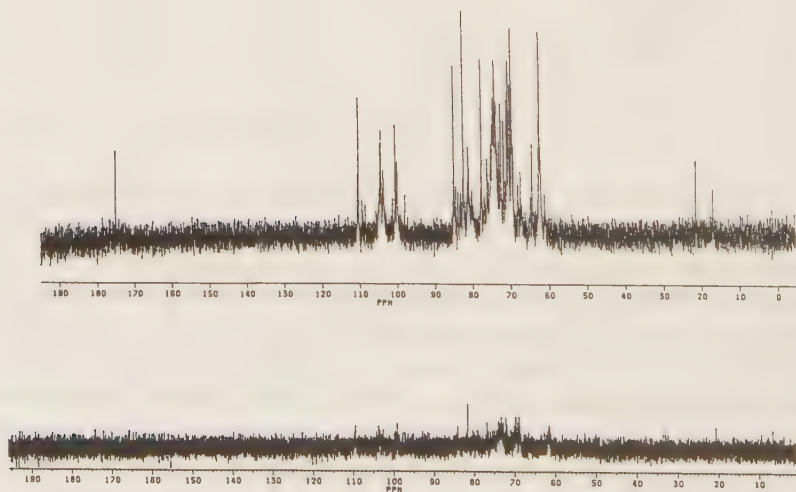


Abb. 10: Einfluß paramagnetischer Ionen auf das ^{13}C -Spektrum eines Polysaccharidgemisches

2.5.7. Methylierungsanalyse

Die Bestimmung der Zuckerverknüpfungen erfolgte mit dem heute bevorzugt eingesetzten Verfahren nach HAKOMORI (1964) über die Darstellung partiell methylierter Alditolacetate. Dieses zeigt besonders bei uronsäurehaltigen Polysacchariden Vorteile, da keine zweite Methylierung, die unter den stark basischen Bedingungen der Analyse leicht zu einer β -Eliminierung der Uronsäuren führen könnte (ASPINALL 1982a), erforderlich ist. Durch Vergleiche der relativen Retentionszeiten und der Massenspektren mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976) war die in Tabelle 11 wiedergegebene Zuordnung der partiell methylierten Alditolacetate möglich.

Tabelle 11: Methylierungsanalysen der Polysaccharide AS 3 und AS 4

Peak	molare Zusammensetzung*		Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
	AS 3	AS 4		
1	3,47	4,13	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	2,68	5,36	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-xylitol	101, 117, 161
3	0,95	3,70	1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 201, 233
4	---	3,86	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
5	5,22	4,45	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-xylitol	87, 99, 101, 117, 129, 189
6	3,0	3,0	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 161, 173, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

Mit Ausnahme des 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitols von Peak 4, das nur im Chromatogramm von AS 4 erschien und von einer terminalen Galaktose stammen mußte, beobachteten wir in den GC-Chromatogrammen beider Polysaccharide die gleichen Derivate.

Arabinose, die ausschließlich in furanosidischer Form vorlag, trat sowohl als terminaler Zucker, wie auch (1→3)-verknüpft auf. Dafür sprachen die Fragmentierungsschemata der Peaks 1 und 3, denen ein 1,4-Di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-arabinitol bzw. ein 1,3,4-Tri-*O*-acetyl-2,5-di-*O*-methyl-arabinitol zugrundeliegen mußten.

Die Verbindung von Peak 2 erkannten wir als 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-xylitol. Sie stellte somit die terminale Form dieses Zuckers dar, der auch noch kettenständig, (1→4)-gebunden auftrat, wie das als 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-xylitol identifizierte Derivat von Peak 5 vermuten ließ.

Die Interpretation des Zerfallsmusters der Verbindung von Peak 6 deutete auf ein 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-galaktitol hin und gab somit einen Hinweis auf (1→4)-verknüpfte Galaktose.

Die molare Zusammensetzung von AS 3 zeigte, daß etwa ein Drittel aller vorliegenden Xylosereste als terminale Zucker auftraten. Demgegenüber waren 80 % aller Arabinoseeinheiten endständig, Galaktose dagegen nur kettenständig gebunden. Arabinosemoleküle mußten aus diesem Grunde im Polysaccharid AS 3 auch die Endpunkte einiger Xylan- und Galaktanketten bilden.

Das Vorliegen von etwas über 50 % aller Galaktosereste in terminaler Form sowie das im Vergleich zu AS 3 erheblich ausgeglichene Verhältnis von terminaler Arabinose zu ihrer kettenständigen Form, deutete auf das getrennte Vorliegen von Arabinan- und Galaktanketten in AS 4 hin. Höhere Anteile an reinen Xylanketten vermuteten wir bei AS 4 in Relation zu AS 3 auch aufgrund des wesentlich höheren Gehaltes an terminaler Xylose.

Da wir keinen Hinweis auf eine Kettenverzweigung erhielten, mußten die Verzweigungspunkte der Polysaccharidketten der Methylierungsanalyse nicht zugänglich gewesen sein.

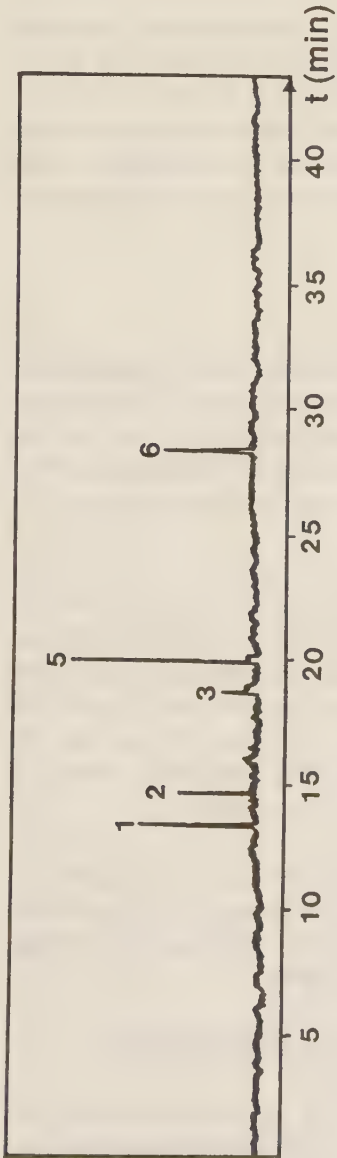


Abb. 11: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides AS 3

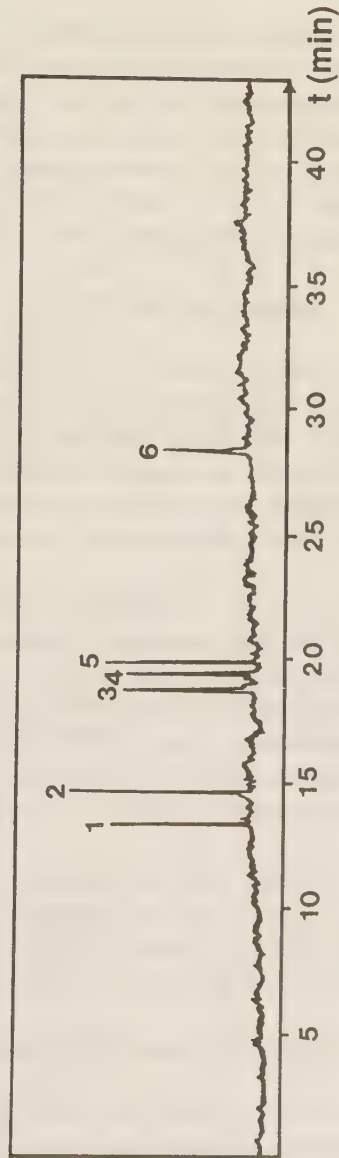


Abb. 12: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides AS 4

Da die stark uronsäurehaltigen Pektine besonders empfindlich auf die alkalischen Verhältnisse während der Methylierung reagieren (STEPHEN 1983a) und sich in keinem Polysaccharid die bei der Neutralzuckerbestimmung deutlich nachweisbare Rhamnose in irgendeiner Bindungsart identifizieren ließ, dürfte dieser Zucker, der in Pektinen häufig die Verzweigungsstelle der Haupt- zu den Seitenketten bildet (TOMODA *et al.* 1980, MASSIOT *et al.* 1988), während der Analyse durch β -Elimination vollständig verlorengegangen sein.

2.5.8. Reduktion der Galakturonsäure

Es gibt mehrere Gründe für das Fehlen entsprechender partiell methylierter Alditolacetate von Uronsäuren bei einer Methylierungsanalyse. Neben ihrem Bestreben zur β -Elimination werden Glucuronide sehr häufig nicht vollständig bis zur Stufe der monomeren Zucker hydrolysiert (INOUE *et al.* 1975). In nichtreduzierter Form bilden Uronsäuren außerdem nicht ausreichend flüchtige Derivate für eine gaschromatographische Bestimmung (RING *et al.* 1978).

Zur Reduktion der Galakturonsäure bedienten wir uns des in der Literatur als Methode der Wahl angesehenen Verfahrens nach TAYLOR und CONRAD (1972). Die Uronsäure wird mit einem Carbodiimidderivat umgesetzt und anschließend durch Natriumborodeuterid zum entsprechenden Neutralzucker reduziert, wobei eine Doppel-Deuteriummarkierung am C-6-Kohlenstoff Aufschluß über seine Herkunft gibt. Die glykosidischen Bindungen der jetzt in veränderter Form vorliegenden ehemaligen Uronsäure reagieren erheblich empfindlicher gegenüber Säurezusätzen.

Nach dreimaliger Reduktion der Polysaccharide AS 3 und AS 4 erhielten wir keine weitere Verringerung des restlichen Galakturonsäuregehaltes. Die quantitative Bestimmung der verbleibenden Uronsäuren (BITTER *et al.* 1962) ergab eine 80 %ige Reduktion von AS 3R bzw. eine 75 %ige Abnahme bei AS 4R.

2.5.9. Methylierungsanalyse der reduzierten Polysaccharide AS 3R und AS 4R

Die Methylierung der Polysaccharide AS 3R und AS 4R erfolgte wiederum nach HAKOMORI (1964), wobei die Zuordnungen durch Vergleiche mit Literaturwerten und anhand der relativen Retentionszeiten getroffen wurden (JANSSON *et al.* 1976).

Tabelle 12: Methylierungsanalysen der carboxylreduzierten Polysaccharide AS 3R und AS 4R

Peak	molare Zusammensetzung*		Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
	AS 3R	AS 4R		
1	3,16	4,07	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 129, 145, 161
2	2,44	5,29	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-xylitol	101, 117, 161
3	2,15	---	1,2,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,4-di- <i>O</i> -methyl-rhamnitol	87, 89, 99, 115, 129, 131, 189
4	0,86	3,65	1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 201, 233
5	2,78	3,92	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 117, 131, 147, 161, 163, 207
6	---	3,81	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
7	4,75	4,39	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-xylitol	87, 99, 101, 117, 129, 189
8	1,06	3,17	1,2,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -methyl-rhamnitol	87, 101, 117, 129, 143, 189, 203
9	10,0	10,0	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 115, 117, 129, 133, 161, 175, 235
10	2,73	2,96	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 161, 173, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

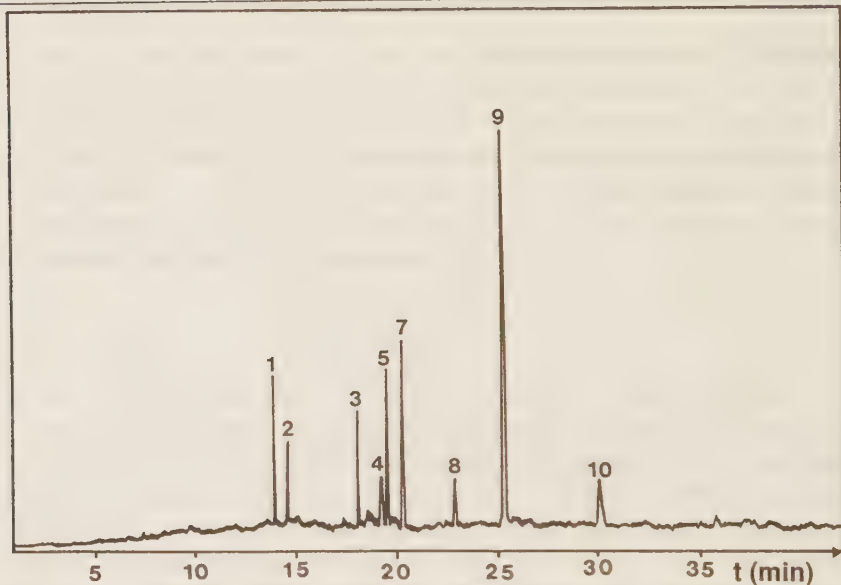


Abb. 13: GC der partiell methylierten Alditolacetate des reduzierten Polysaccharides AS 3R

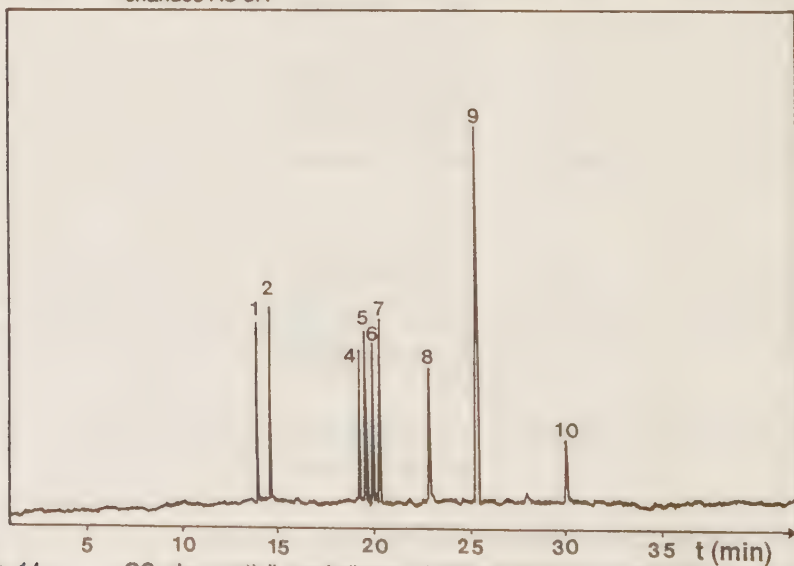


Abb. 14: GC der partiell methylierten Alditolacetate des reduzierten Polysaccharides AS 4R

Arabinose, Xylose und Galaktose lagen in denselben Bindungsarten wie bei den Methylierungsanalysen der genuinen Polysaccharide vor. Veränderungen in den molaren Verhältnissen der einzelnen Derivate zu den vorausgegangenen Analysen ließen sich auch nach der Galakturonsäurereduktion nicht erkennen.

Zusätzlich wiesen die Gaschromatogramme der partiell methylierten Alditolacetate der carboxylreduzierten Polysaccharide AS 3R und AS 4R vier bzw. drei neue Peaks auf. Es handelte sich hier bei Peak 3 und Peak 8 um 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methyl-rhamnitrol bzw. 1,2,4,5-Tetra-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-rhamnitrol, so daß die erste Verbindung von (1→2)-gebundener, die zweite von (1,2,4)-verknüpfter Rhamnose stammen sollte. Kettenständige, unverzweigte Rhamnoseeinheiten zeigte nur das Chromatogramm des carboxylreduzierten Polysaccharides AS 3R.

Der doppelte Deuteriumeinbau am C-6-Kohlenstoff erlaubte mit den Fragmenten *m/e* 235, 175 und 115 im Zerfallsmuster von Peak 9, dieses auf ein 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-galaktitol-6,6- d_2 zurückzuführen. Das Derivat sollte daher von (1→4)-gebundener Galakturonsäure stammen. Die Bruchstücke *m/e* 207, 163 und 147 im Fragmentierungsschema von Peak 5 ließen sich einem 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol-6,6- d_2 zuordnen und ermöglichten damit eine eindeutige Identifizierung einer terminalen Galakturonsäure.

Mehr als 20 % der gesamten Galakturonsäure müssen im Polysaccharid AS 3R nach den Werten der molaren Zusammensetzung in terminaler Form vorliegen, während der größte Teil dieses Zuckers (1→4)-Verknüpfung aufweist und damit vermutlich die Hauptkette des Pektins bildet. Die ebenfalls in der Hauptkette enthaltene Rhamnose ist nur zu etwa einem Drittel verzweigt, während der restliche Teil in (1→2)-Bindung vorliegt.

Demgegenüber enthält AS 4R Rhamnose ausschließlich in (1,2,4)-verknüpfter Form. Zusammen mit (1→4)-gebundener Galakturonsäure bilden beide Zucker vermutlich die Hauptkette von AS 4R. Der Gehalt an terminaler Galakturonsäure liegt in diesem Polysaccharid geringfügig über demjenigen von AS 3R.

2.5.10. Partialhydrolyse der reduzierten Polysaccharide AS 3R und AS 4R

Aufgrund der unterschiedlichen Spaltungsgeschwindigkeit einzelner glykosidischer Bindungen kann die Partialhydrolyse weitere Auskünfte über die Struktur des Polysaccharides geben. α -Verknüpfte Zucker hydrolysieren leichter als β -gebundene, Furanosen schneller als Pyranosen. Befinden sich leicht hydrolysierbare Zuckerbausteine in terminaler oder ähnlicher Position, lassen sie sich unter milden Bedingungen ganz oder teilweise abspalten, ohne daß dadurch die Polysaccharidgrundstruktur allzusehr verändert wird (BUCHALA *et al.* 1981, ASPINALL 1982b).

Zur partiellen Depolymerisierung der Polysaccharide AS 3R und AS 4R hydrolysierten wir diese zwei Stunden mit 0,05 M Trifluoressigsäure bei 100° C. Dünnschichtchromatographisch war neben Arabinose bei beiden Polysacchariden auch Galaktose in allerdings geringerer Konzentration nachweisbar, während Xylose und Rhamnose nur in Spuren erschienen. Im Rf-Bereich der Di- und Trisaccharide erkannten wir ebenfalls einige schwächere Banden. Nach Entfernen dieser Mono- und Oligosaccharide durch Dialyse fanden wir bei der Zuckeranalyse des Partialhydrolysates AS 3RP noch wenig Arabinose, während dieser Zucker in AS 4RP nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 13: Molare Zuckerzusammensetzung der Partialhydrolyseprodukte AS 3RP und AS 4RP

	AS 3RP	AS 4RP
Rhamnose	1,49	1,18
Arabinose	0,15	---
Xylose	1,0	1,0
Galaktose	4,27	3,16

2.5.11. Methylierungsanalyse der Partialhydrolysate AS 3RP und AS 4RP

Die Methylierungsanalyse der Partialhydrolyseprodukte AS 3RP und AS 4RP lieferte die in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 14: Methylierungsanalysen der Partialhydrolysate AS 3RP und AS 4RP

Peak	molare Zusammensetzung*		Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
	AS 3RP	AS 4RP		
1	1,74	1,47	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 129, 145, 161
2	5,23	2,57	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-xylitol	101, 117, 161
3	4,51	3,88	1,2,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,4-di- <i>O</i> -methyl-rhamnitol	87, 89, 99, 115, 129, 131, 189
4	2,78	3,39	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 117, 131, 147, 161, 163, 207
5	---	3,88	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
6	4,66	---	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-xylitol	87, 99, 101, 117, 129, 189
7	0,50	2,31	1,2,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -methyl-rhamnitol	87, 101, 117, 129, 143, 189, 203
8	10,0	10,0	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 115, 117, 129, 133, 161, 175, 235
9	2,81	---	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 161, 173, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

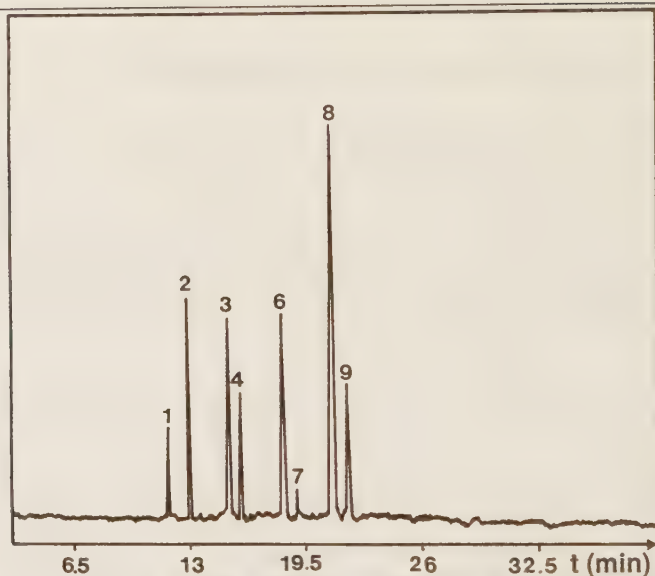


Abb. 15: GC der partiell methylierten Alditolacetate des partialhydrolysierten Polysaccharides AS 3RP

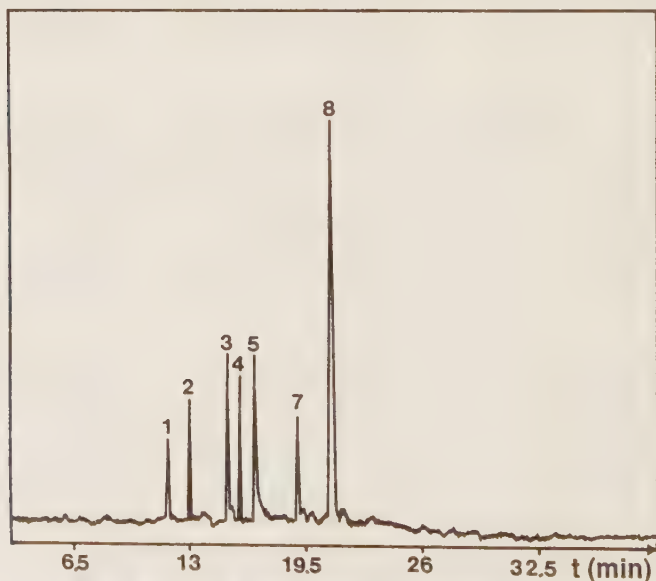


Abb. 16: GC der partiell methylierten Alditolacetate des partialhydrolysierten Polysaccharides AS 4RP

In beiden Abbauprodukten ließ sich (1→3)-gebundene Arabinose nicht mehr nachweisen. Darüber hinaus fehlte im Chromatogramm von AS 4RP der Peak des 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-xylitols der (1→4)-verknüpften Xylose sowie derjenige des 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-galaktitols der kettenständigen, (1→4)-verknüpften Galaktose.

Im Polysaccharid AS 3RP waren die molaren Anteile der terminalen und (1→4)-gebundenen Galakturonsäure sowie diejenigen der (1→4)-verknüpften Galaktose und der (1→4)-gebundenen Xylose mit dem Nativpolysaccharid nahezu identisch. Demgegenüber zeigte Rhamnose eine um 50 % reduzierte Anzahl an (1,2,4)-gebundenen Molekülen, die sehr gut mit einer entsprechenden Zunahme an (1→2)-Verknüpfungen dieses Zuckers korrelierte. Daraus ließ sich folgern, daß die Verzweigungsstelle der in der Hauptkette gebundenen Rhamnose in Position C-4 liegt, an die kurze, (1→3)-verknüpfte Arabinanketten, (1→4)-verknüpfte Xylanketten oder ebenso verknüpfte Galaktanketten binden.

Der bereits durch die Methylierung der Ausgangsverbindung erhaltene Hinweis auf Xylan- und Galaktanketten mit endständigen Arabinoseresten bestätigte sich. Der Anteil an terminaler Xylose in AS 3RP zeigte einen im Vergleich zum Nativpolysaccharid um über 100 % erhöhten Wert. Im Gegensatz dazu konnte auch im Partialhydrolysat keine endständige Galaktose nachgewiesen werden.

Nachdem der Anteil an terminaler Arabinose in AS 3RP deutlich verringert war, mußten ihre verbliebenen Reste die Endpunkte der Galaktanketten bilden, während jetzt offenbar keine fremden Zuckereinheiten mehr die Endpunkte der Xylanketten bildeten.

Die Methylierungsanalyse des Hydrolyseproduktes AS 4RP lieferte divergierende Ergebnisse. Im Vergleich zum Nativpolysaccharid zeigte es eine nur leicht veränderte Zusammensetzung in bezug auf (1→4)-gebundene und terminale Galakturonsäure sowie endständige Galaktose.

Dagegen fanden wir jetzt neben geringeren Anteilen an (1,2,4)-verknüpfter Rhamnose diesen Zucker auch in hoher Menge in, im Nativpolysaccharid nicht vorliegender, (1→2)-Bindung. Die Partialhydrolyse hatte demnach zu einer Abspaltung der an Position C-4 gebundenen Seitenketten geführt.

Eine Erklärung für das Fehlen (1→4)-verknüpfter Galaktoseeinheiten bei gleichzeitig unverändertem Gehalt dieses Zuckers in terminaler Form könnte auf die für AS 4R möglicherweise zu drastischen Partialhydrolysebedingungen zurückzuführen sein. Die Depolymerisierung verkürzte die Galaktanketten offenbar auf eine Einheit, ohne sie jedoch total abzuspalten.

Demgegenüber sprach das Vorliegen von nur noch endständig erscheinender Arabinose und Xylose, bei gleichzeitig erheblich verminderten molaren Mengenverhältnissen, deutlich für einen Totalverlust der Seitenketten dieser Zucker. Dieser betrug bei Xylose 50 % und bei Arabinose sogar ca. 66 %.

Der höhere molare Anteil der Rhamnose im Partialhydrolysat dürfte auf eine rein mathematische Ursache zurückzuführen sein. Als Bezugszucker für die Berechnung der molaren Zusammensetzung wählten wir die jeweils am häufigsten vorkommende (1→4)-gebundene Galakturonsäure. Ihrer nach SWEET korrigierten Peakfläche teilten wir willkürlich den Wert 10,0 zu und setzten dazu, unter der Voraussetzung ihres annähernd gleichbleibenden Gehaltes, alle anderen Flächen in Bezug. Da sich der Anteil an diesem Bezugszucker offenbar selbst verkleinert hatte, ergaben sich für sämtliche hierauf bezogenen Flächen etwas zu hohe Werte.

Berechnet man die molare Zusammensetzung der übrigen Zucker mit Bezug auf einen insgesamt konstant gebliebenen Rhamnosegehalt, so ergibt sich ein noch höherer Verlust an Seitenketten, der auch die Galaktanketten miteinschließt.

2.5.12. Strukturvorschläge für die Polysaccharide AS 3 und AS 4

Bei den Polysacchariden AS 3 und AS 4 sollte es sich nach den durchgeführten Analysen um komplex zusammengesetzte Glykanogalakturonane handeln.

Ihre Hauptketten bestehen aus (1→4)- α -verknüpften Galakturonsäure- und (1→2)-gebundenen Rhamnoseeinheiten, wobei ca. ein Drittel aller Rhamnosereste von AS 3 bzw. alle Rhamnosemoleküle von AS 4 Verzweigungsstellen zu unterschiedlich aufgebauten Seitenketten in Position C-4 aufweisen. Etwa 48 % der Galakturonsäuren von AS 3 und ca. 40 % der sauren Gruppen von AS 4 liegen teilweise mit Methanol verestert vor.

Die kurzen Seitenketten von AS 3 bestehen entweder aus (1→4)-verknüpften Galaktoseresten mit einer terminalen Arabinoseeinheit oder aus ebenso verknüpften Xylanketten, wobei ca. 50 % dieser Ketten ebenfalls eine endständige Arabinose tragen. Seltener liegen (1→3)-gebundene Arabinanketten vor.

Demgegenüber sprechen die Ergebnisse unserer Untersuchungen bei Polysaccharid AS 4 nicht für das Vorhandensein endständiger Arabinoseeinheiten in den (1→4)-gebundenen Xylan- bzw. Galaktanketten. Außerdem dürften die (1→3)-verknüpften Arabinanketten im Vergleich zu AS 3 länger sein.

AS 3

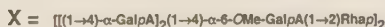
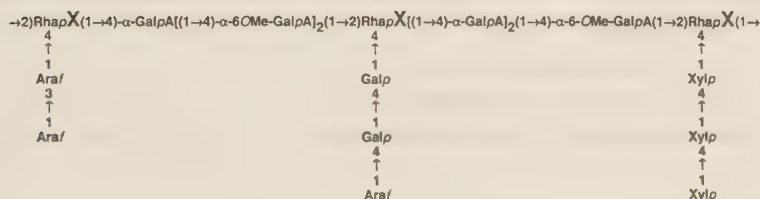


Abb. 17: Strukturvorschlag für das Polysaccharid AS 3

AS 4

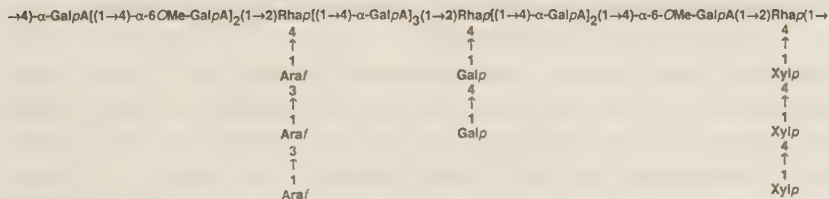


Abb. 18: Strukturvorschlag für das Polysaccharid AS 4

2.6. Partielle Charakterisierung des Polysaccharides AS 1

2.6.1. Zuckeranalyse

Die Totalhydrolyse mit 2 M Trifluoressigsäure lieferte im Dünnschichtchromatogramm nur den Zucker Xylose. Die quantitative Analyse im Zuckeranalysator zeigte jedoch, daß zusätzlich noch 4-*O*-Methylglucuronsäure vorlag. Das molare Verhältnis zwischen Xylose und der Uronsäure betrug etwa 8 : 1.

Tabelle 15: Molare Zuckerzusammensetzung des Polysaccharides AS 1

Xylose	8,03
4- <i>O</i> -Methylglucuronsäure	1,0

Die Bestimmung erfolgte im Zuckeranalysator über die Detektion mit Orcin / H_2SO_4 .

2.6.2. Methylierungsanalyse von AS 1

Die Bestimmung der Zuckerverknüpfungen erfolgte nach HAKOMORI (1964). Durch Vergleich der relativen Retentionszeiten der partiell methylierten Alditolacetate und deren Massenspektren nach GC-MS-Analyse mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976) ließen sich die in Tabelle 16 wiedergegebenen Zuordnungen treffen.

Die im Gaschromatogramm mit Peak 3 dominierende Verbindung identifizierten wir als 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-xylitol, ein Derivat, das von einer (1→4)-verknüpften Xylose stammen sollte. Daneben lag Xylose noch in zwei anderen Bindungsarten vor. Dem 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-xylitol in Peak 1 mußte diese Pentose als terminaler Zucker zugrundeliegen, während das 1,2,4,5-Tetra-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-xylitol in Peak 4 das Vorkommen von Xylose in (1,2,4)-verknüpfter Form andeutete. Bei Peak 2 handelte es sich möglicherweise um das Abbauprodukt einer Aldobiuronsäure.

In der molaren Zusammensetzung dominierte die (1→4)-verknüpfte Xylose. Demzufolge scheint das Polysaccharid aus langen Xylanketten aufgebaut, die nur von relativ wenigen Verzweigungsstellen unterbrochen werden. Die genaue Struktur der sich dort anschließenden, nur aus einer oder mehreren Xyloseeinheiten bzw. 4-*O*-Methylglucuronsäureresten bestehenden Seitenketten ließ sich hieraus nicht ablesen.

Da das Polysaccharid im Granulozytenausstrichtest nur eine mäßige Phagozytosestimulierung auslöste, wurden keine weiteren Strukturuntersuchungen durchgeführt.

Tabelle 16: Methylierungsanalyse des Polysaccharides AS 1

Peak	molare Zusammensetzung* AS1	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	0,5	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-xylitol	101, 117, 161
2	---	nicht zuzuordnen	
3	10,0	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-xylitol	87, 99, 101, 117, 129, 161, 189
4	1,7	1,2,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -methyl-xylitol	87, 129, 189

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

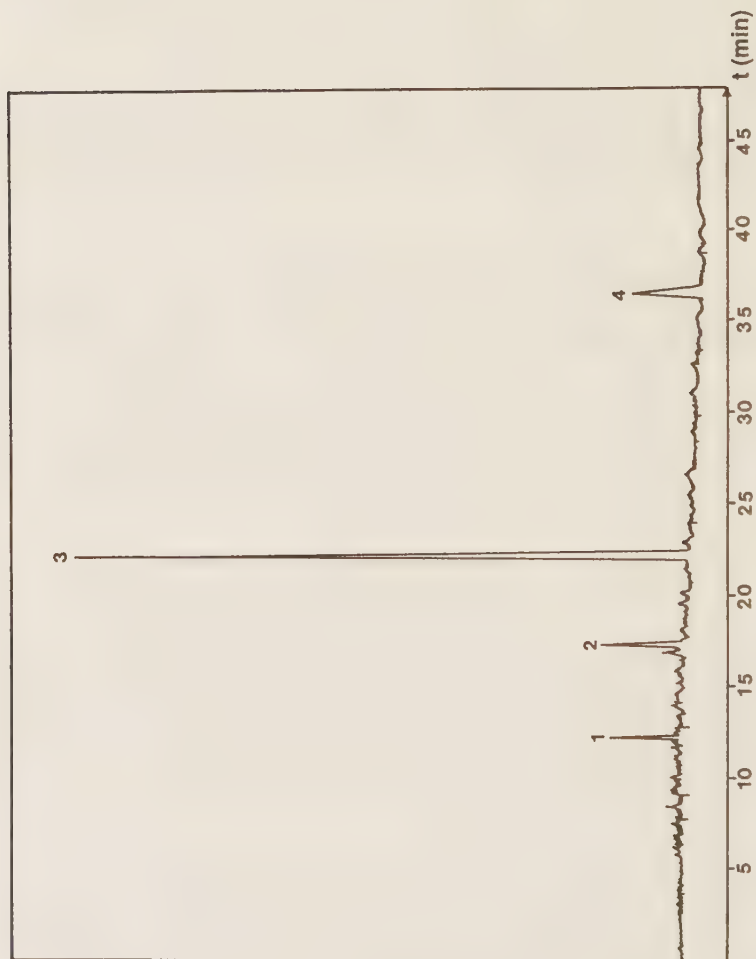


Abb. 19: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides AS 1

2.7. Vergleiche der isolierten Polysaccharide AS 1, AS 3 und AS 4 mit Polysacchariden der Literatur

Die aus dem Wasserextrakt isolierten Polysaccharide AS 3 und AS 4 mit Molekulargewichten von 7.600 D bzw. 15.000 D gehören zur Klasse der **Glykanogalakturonane** (STEPHEN 1983b). Beide zeigen einen relativ ähnlichen strukturellen Aufbau mit einer Hauptkette, bestehend aus teilweise mit Methanol veresterten, (1→4)- α -gebundenen Galakturonsäureresten und (1→2)-verknüpften Rhamnoseeinheiten, wobei die Rhamnosemoleküle am C4-OH teilweise Verzweigungsstellen zu Seitenketten besitzen. Diese bestehen entweder aus kurzen Galaktan-, Arabinan- oder Xylanketten, wobei terminale Arabinose bei AS 3 das nicht reduzierende Ende der Galaktan- und einiger Xylanketten darstellt.

Ähnlich aufgebaute Verbindungen isolierten STEVENS und SELVENDRAN (1984) aus der Karotte *Daucus carota* und ROMBOUITS und THIBAUT (1986) aus dem Mark der Zuckerrübe. EDA und Mitarbeiter klärten 1986 die Struktur eines Glykanogalakturonans aus Zellwänden von *Nicotiana tabacum* Mesophyll und MURALIKRISHNA und Mitarbeiter charakterisierten 1987 ein Rhamnogalakturonan aus dem Leinsamenschleim.

Die Seitenketten des Karottenpektsins unterscheiden sich von denen der Polysaccharide AS 3 und AS 4 besonders durch einen, vor allem im Arabinanteil nachgewiesenen, hohen Verzweigungsgrad. In Übereinstimmung mit unseren Verbindungen enthält das Karottenpektin jedoch auch die weniger häufig vorkommenden (1→4)-Xylanketten, die im Tabakpektin fehlen. Terminale Fucoseeinheiten bilden ein Charakteristikum des Leinsamenpektsins, bei dem jedoch keine Arabinose identifiziert werden konnte und die Hauptkette Verzweigungen in Position C-3 der Rhamnose zeigt.

Das aus dem alkalischen Wasserextrakt der 1 + 0,5 Fällung isolierte 4-O-Methylglucuronoxylan mit einem Molekulargewicht von 43.000 D enthält eine (1→4)-verknüpfte Xylosehauptkette, bei der ca 15 % der Kettenglieder Verzweigungspunkte am C2-OH aufweisen.

Die Isolierung ähnlicher Verbindungen gelang bereits aus Lucerne (ASPINALL *et al.* 1966), aus Karotten (ASPINALL *et al.* 1983), aus *Eupatorium perfoliatum* und *Eupatorium cannabinum* L. (VOLLMAR *et al.* 1986) und *Quercus subur* (ASENSIO

1988). Terminale 4-*O*-Methylglucuronsäure findet sich jeweils immer direkt mit die Verzweigungsstelle der Hauptkette verknüpft und wird nur in äußerst seltenen Fällen durch eine einzelne endständige Xyloseeinheit ersetzt.

Aufgrund dieser für 4-*O*-Methylglucuronoxylane charakteristischen Strukturmerkmale ist ein ähnlicher Aufbau auch für das Polysaccharid AS 1 denkbar.

Über immunstimulierende Eigenschaften für Polysaccharide aus dieser Klasse liegen nur Angaben für ein 4-*O*-Methylglucuronoxylan aus *Eupatorium perfoliatum* L. mit einem Molekulargewicht von 500.000 D vor (VOLLMAR *et al.* 1986).

C. POLYSACCHARIDE AUS ARNICAЕ MONTANAE L. HERBA

1. Kenntnisstand

1.1. Systematik und Verbreitung

Den größten Bekanntheitsgrad unter den 32 Arten der Gattung *Arnica* besitzt *Arnica montana* Linné. Die ausdauernde, erst im zweiten Jahr blühende Pflanze stammt aus Mittel-, Süd- und Osteuropa und findet sich heute vorzugsweise in Süddeutschland, Norditalien, Rußland, der Tschechoslowakei, den Balkanländern, aber auch in Mittelasien und Nordamerika (HOPPE 1975), wo sie auf sandigen, humushaltigen, torfigen, moorigen, feuchten und sonnigen Wiesen bis in 2600 m Höhe gedeiht.

Die botanische Klassifizierung ordnet die Pflanze in die Abteilung: Angiospermae, die Klasse: Dicotyledonae, die Unterklasse: Sympetalae, die Ordnung: Asterales, die Familie: Asteraceae, die Unterfamilie: Tubuliflorae, den Tribus: Senecionae, die Gattung: *Arnica*, den Subgenus: *Montana*, die Art: *montana* ein (MAGUIRE 1943).

Neben der offiziellen Bezeichnung *Arnica montana* verfügt die Pflanze auch über zahlreiche, teilweise falsch verwendete Synonyme, wie beispielsweise:

Tabelle 17: Synonyme für *Arnica montana* L.

<i>Doronicum montanum</i> LAM.	<i>Caltha alpina</i>
<i>Doronicum arnica</i> DESF.	<i>Chrysanthemum latifolium</i>
<i>Doronicum austriacum</i> quartum	<i>Nardus celtica</i> altera
<i>Doronicum germanicum</i>	<i>Panacea lapsorum</i>
<i>Doronicum oppositifolium</i>	<i>Parmica montana</i>
<i>Doronicum plantaginis folio alterum</i>	

Die volkstümlichen Bezeichnungen differieren je nach Region erheblich und reichen u. a. von Bergwohlverleih oder nur Wohlverleih über Wund-, Fall-, Verfang-, Gams-, St. Luzians-, Engels- und Stichkraut bis zu Johannes- und Bergdotterblume (FABER 1953). Der englische Sprachgebrauch kennt *Arnica montana* L. auch als Celtic nard, Leopards bane, Mountain arnica oder Mountain tobacco.

Besonders häufig treten Verwechslungen mit anderen gelbblühenden Asteraceen wie dem Wiesenbocksbart, *Tragopogon pratensis* oder mit *Calendula officinalis*, der Ringelblume, auf.

1.2. Botanische Beschreibung

Die äußere Erscheinung von *Arnica montana* L. ist durch ein 20 bis 50 cm hohes, im Juni und Juli leuchtend dottergelb blühendes Kraut gekennzeichnet, das über einen angenehmen, stark aromatischen Geruch verfügt.

Das ca. 10 cm lange und bis 5 mm dicke, horizontale, zylinderförmige, rotbraune Rhizom weist eine feinhöckrige Oberfläche auf und besitzt eine meist unverzweigte Gestalt mit deutlich hin- und hergebogener Form. An der Unterseite finden sich zahlreiche Wurzeln, die bei einem Durchmesser von etwa 1 mm eine Länge von bis zu 8 cm erreichen.

Vier bis sechs paarweise auftretende Blätter bilden eine flachausgebreitete, grundständige Rosette; sie messen 4 cm, seltener 7 cm in der Breite, während ihre Länge häufig 10 cm nicht überschreitet, manchmal jedoch auch das Doppelte erreicht. Ihre längliche, verkehrt eiförmige oder lanzettliche Form verschmälert sich zu einem kurzen Stiel und zeigt sich fast ganzrandig, wobei eine dichte, kurze Behaarung auffällt. Die gelbgrüne Blattunterseite wird von fünf bis sieben Nerven durchzogen, während die kleineren Stengelblätter nur drei Nerven besitzen.

Diese sitzen paarweise an aufrechten, drüsig behaarten, im oberen Teil wenig verzweigten Stengeln, die öfters nur ein endständiges, 5 bis 7 cm breites Blütenköpfchen, meist jedoch deren drei tragen, wobei die beiden unteren in den Achseln der obersten Blätter stehen.

Der flachgewölbte Blütenstandsboden der Gesamtblütenstände trägt einen Hüllkelch aus 20 bis 40 zweireihig angeordneten, bis 1,5 cm langen, schmal lanzettlichen, außen bräunlichgrünen und innen hellgelben Blättchen, die 14 bis 20 zungenförmige Randblüten und zahlreiche röhrenförmige Scheibenblüten umgeben.

Die 1,5 cm langen, zwittrigen Röhrenblüten weisen im unteren Teil hellgelbe Farbe auf und erweitern sich in halber Höhe, wobei sie in einen fünfspaltigen orangegelben Saum mit leicht zurückgekrümmten, dreieckigen Zipfeln auslaufen. Etwa in der Mitte der Kronröhre inseriert finden sich fünf ca. 6 mm lange, mit ihrer Kutikula zu einer Röhre verklebte Antheren. Aus der Kronröhre heraus ragt der Griffel mit zweispaltiger Narbe. Der 4 bis 6 mm lange bräunliche, schwach kantige Fruchtknoten trägt an der Spitze einen Pappus grauweißer, borstiger Haare von 3 bis 8 mm Länge.

Bei den weiblichen 15 bis 25 mm, seltener bis zu 35 mm langen Zungenblüten fehlen die Antheren oder sind stark reduziert. Ihre im unteren Teil röhrenförmige, blaßgelbe Blütenkrone verbreitert sich nach oben zu einer breitlinealen, orangegelben, dreizähligen Zunge. Griffel, Fruchtknoten und Pappus entsprechen den Röhrenblüten.

Die Pappus tragenden Früchte zeigen die typischen Umriss der Achänen (FABER 1953, BERGER 1960, DAB 9).



Foto 2: *Arnica montana* L.

1.3. Volksmedizinische Verwendung

Erste Berichte über die externe und interne Anwendung der Pflanze bei Verletzungen reichen bis in das 16. Jahrhundert zurück.

Die unterirdischen Organe und die Blüten zählten im 18. Jahrhundert gleichberechtigt zu den wichtigsten Heilmitteln. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts verlor *Arnica montana* L. durch allzu kritiklosen Einsatz an Bedeutung, blieb jedoch trotzdem fester Bestandteil vieler Arzneibücher (FABER 1953).

Tinktur und Blüten finden sich heute im DAB 9 ebenso wie in zahlreichen weiteren Pharmakopöen. Das Homöopathische Arzneibuch verwendet neben den getrockneten, unterirdischen Pflanzenteilen auch die getrockneten Blütenstände sowie die ganze, frische, blühende Pflanze (HAB 4. Nachtrag).

Der äußere Gebrauch in Form von Salbe oder Tinktur basiert auf der anerkannten antiseptischen, antiphlogistischen, granulationsbeschleunigenden und resorptionsfördernden Wirkung bei Blutergüssen und Exsudaten. Verschiedene Zubereitungen finden in der Therapie Einsatz bei Prellungen, Quetschungen, Hämatomen, Schwellungen infolge stumpfer Verletzungen, bei Thrombosen und rheumatischen Beschwerden, Entzündungen von Insektenstichen und als Wundantiseptikum.

Wegen der schon vor 200 Jahren dokumentierten unerwünschten Nebenwirkungen bei innerer Applikation wird **Arnica montana** L. heute nur noch eingeschränkt peroral als Atem- und Kreislaufanaleptikum, Vasomotorikum und Herztonikum verwendet. Die bei peroraler Anwendung beschriebenen Nebenwirkungen reichen von Magenreizungen, über Herz- und Kreislaufbeschwerden bis zum Herzstillstand bei Überdosierung. In der Standardzulassung von Arnikablüten ist daher keine perorale Applikation vorgesehen.

In der ROTEN LISTE nimmt die Pflanze als Bestandteil von derzeit ca. 270 Fertigpräparaten einen Spitzenplatz unter den Phytotherapeutika ein.

Der große Bedarf an dieser Droge kann durch einfaches Sammeln der unter Naturschutz gestellten Pflanze nicht gedeckt werden. Die Aufnahme der **Arnica montana** L. in die Liste gefährdeter Pflanzenarten des Washingtoner Artenschutzabkommens verbietet, von wenigen Ausnahmen abgesehen, auch den Import.

Eine wirtschaftliche Kultivierung als mögliche Alternative zeigte bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse, obzwar erfolgreiche Anbauversuche bereits aus den ersten Jahrzehnten dieses Jahrhunderts datieren (WEHRHAHN 1931, DÖRING 1943). Deshalb entschloß sich die Arzneibuchkommission, im DAB 9 für die Monographie Arnikablüten als Stammpflanze zusätzlich Arnica chamissonis LESS. ssp. foliosa (NUTT.) zuzulassen, die über ein ähnliches Inhaltsstoffmuster verfügt, sich aber problemloser anbauen läßt.

1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

- Ätherisches Öl:** Aus Blüten, von butterartiger Konsistenz durch 40 bis 60 %igen Anteil an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, besonders Palmitin-, Linol-, Myristin-, Linolen- und Palmitoleinsäure (KATING *et al.* 1970). Thymol, Thymolmethylether (RÜCKER 1970).
- Aus Wurzeln, bei Raumtemperatur flüssig durch sehr niedrigen Fettsäuregehalt (WILLUHN 1972). Thymolmethylether, 4-Hydroxythymoldimethylether (BRUNNER 1969).
- Sesquiterpenlactone:** Arnifolin (EVSTRATOVA *et al.* 1969), Tetrahydrohelenalin, 11,13-Dihydrohelenalin und seine Ester mit Essigsäure, Isobuttersäure, Methacrylsäure und Isovaleriansäure (POPLAWSKI *et al.* 1971), Helenalinacetat (LIST *et al.* 1974), Helenalinmethacrylat (HERRMANN *et al.* 1978), Helenalinester mit Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure, Isovaleriansäure, Tiglinsäure, 11,13-Dihydrohelenalintiglinat (WILLUHN *et al.* 1983a), 6-O-Isobutyryl-tetrahydrohelenalin, 2- β -Ethoxy-6-O-isobutyryl-2,3-dihydrohelenalin (WILLUHN *et al.* 1984).
- Phenolcarbonsäuren:** Kaffeesäure, Vanillinsäure, Gentisinsäure, p-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure, o-Hydroxyphenylelessigsäure, Protocatechusäure, Ferulasäure (SWIATEK *et al.* 1978), Chlorogensäure (MARCHISHIN *et al.* 1981).
- Carotinoide und Pigmente:** α - und β - Carotin, Cryptoxanthin, Flavochrom, Mutachrom, Aureoxanthin, Luteoxanthin, Lutein-5,6-epoxid, Translutein, Cislutein Neo A und B in freier und mit Palmitin-, Öl- und Myristinsäure veresterter Form (VANHAELEN 1973).
- Flavonoide:** Isorhamnetin, Kämpferol, Quercetin, Quercetin-3-glucogalakuronid (SANER *et al.* 1966), Pectolarigenin (POPLAWSKI *et al.* 1971), Apigenin-6-O- β -D-glucopyranosid, Isoquerci-

tirin, Astragalin, Luteolin-7-glucosid und -7- β -rutinosid (MARCHISHIN *et al.* 1981), Hispidulin, Jaceosidin, 6-Methoxykämpferol, Betuletol (MERFORT 1984), Eupafolin, Spinacetin, Laciniatin, Patuletin, Chrysoeriol, Apigenin (MERFORT 1985), Hispidulin-7-O- β -glucosid, Isorhamnetin-3-O- β -glucosid, Spinacetin-, Patuletin- und 6-Methoxykämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (MERFORT *et al.* 1987), Quercetin- Kämpferol-, Patuletin- und Isorhamnetin-3-O- β -D-glucuronid (MERFORT *et al.* 1988), 3',4'-Di-methyl-6-methoxyquercetin, Tricin (EBERT *et al.* 1988).

Oligo- und Polysaccharide: Aus den Blüten: Glucose-, xylose- und glucuronsäurehaltige Polysaccharide (MARCHISHIN *et al.* 1981).

Aus den Wurzeln: Oligofructoside (LOMBARD *et al.* 1981), Oligosaccharide (WHITE *et al.* 1985).

Terpene: β -Sitosterol (RÜCKER 1970), Loliolid (HOLUB *et al.* 1975).

Diversa: Polyacetylene in den Wurzeln (BRUNNER 1969), N-Ethoxycarbonyl-L-prolinamid (HOLUB *et al.* 1977), Scopoletin, Umbelliferon, Histidin, Asparaginsäure (MARCHISHIN *et al.* 1981),

1.5. Bisherige pharmakologische Untersuchungen

Als Wirkprinzipien galten bisher das Ätherische Öl und die Sesquiterpenlactone.

1. Die Hauptbestandteile des Ätherischen Öls, Thymol und seine Derivate sowie die Polyacetylene, erklären z. T. die bakteriostatische und antiseptische Wirksamkeit (WILLUHN 1984).

2. In in-vitro-Versuchen konnte kürzlich Thymol als starker Hemmer der Cyclooxygenase erkannt werden. Es dürfte deshalb, zumindest bei topischer Anwendung auch teilweise für die antiphlogistische Wirkung der Droge verantwortlich sein (WAGNER *et al.* 1988a).

3. Die Sesquiterpenlactone Helenalin und 10,13-Dihydrohelenalin besitzen infolge der Fähigkeit ihrer α -ständigen Exomethylengruppe am γ -Lactonring, sich nach Art einer Michael-Addition an Nukleophile zu binden, enzymhemmende Eigenschaften. Hierzu zählen die antimikrobielle und fungistatische Wirkung, wobei in diesem Fall der α,β -ungesättigten Enon-Gruppierung des Cyclopentenonringes als zweiter, zusätzlicher funktioneller Gruppe besondere Bedeutung zufällt (LEE *et al.* 1977, WILLUHN *et al.* 1982).
4. Die Arnika-Sesquiterpenlactone erwiesen sich außerdem als antiphlogistisch. Am carrageenaninduzierten Rattenpfotenödem und am chronischen Adjuvans-Arthritis Modell zeigte Helenalin im Gegensatz zu 11,13-Dihydrohelenalin eine signifikante Aktivitätserhöhung. Tetrahydrohelenalin zeigte keine Wirkung (HALL *et al.* 1979).
5. Die Verminderung der Verfügbarkeit von Plättchenfaktor III, der Retraktion der Fibrinstränge zwischen Thrombozyten sowie der Ausbreitung dieser Zellen und die Hemmung ihrer durch Kollagen induzierten Aggregation *in vitro*, legt ebenfalls die Vermutung nahe, daß Helenalin intrazelluläre Enzyme angreift (WEIL *et al.* 1988).
6. Helenalin übt atemanaleptische Effekte aus. Gleichzeitig verfügt es über eine kurze positiv inotrope Wirkung, die bei Überdosierung zu einer Herzmuskellähmung während der Systole führt (WILLUHN 1981) und für die beobachteten Nebenwirkungen verantwortlich zeichnet.
7. Die antitumoralen Eigenschaften der Arnika-Sesquiterpenlactone beruhen auf deren cytotoxischen Effekten. Selektive Alkylierungen nukleophiler Gruppen an Enzymen, die einen regulierenden Einfluß auf die Zellteilung ausüben, lösen eine Hemmung der DNA- und der Proteinsynthese aus (LEE *et al.* 1981).
8. Beeinflussungen des mononukleärphagozytären Systems im Sinne einer unspezifischen Immunstimulierung erkannten WAGNER und Mitarbeiter (1985) für ein aus einem wässrigen Extrakt gewonnenes Polysaccharidgemisch. Bereits 1974 hatte BUSCHMANN Arnikaextrakten mit niedermolekularen, lipophilen Inhaltsstoffen ähnliche Eigenschaften zugeschrieben.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Identitäts- und Reinheitsuntersuchungen

Da die über den Handel erhältlichen Drogen sehr häufig verfälscht sind (BAUER *et al.* 1987), überprüften wir dünn-schichtchromatographisch die Identität der von der Firma A. Galke GmbH erworbenen Charge von *Arnica montana L.* (WILLUHN *et al.* 1983b, DAB 9, WAGNER *et al.* 1983). Die Ergebnisse sprachen für eine nicht verfälschte, identische Drogencharge.

2.2. Isolierung und Fraktionierung von Rohpolysaccharidfraktionen

Wir unterwarfen die getrocknete und pulverisierte Droge einer erschöpfenden Soxhletextraktion mit Petrolether, Chloroform und Methanol. Den getrockneten Drogenrückstand mazerierten wir anschließend 24 Stunden mit Wasser, konzentrierten den Extrakt unter vermindertem Druck und erhielten durch Zugabe von einem und vier Volumenteilen Ethanol zwei Rohpolysaccharidfraktionen. Die prozentualen Ausbeuten und molaren Zuckerzusammensetzungen der dialysierten und gefriergetrockneten Fraktionen zeigt Tabelle 18.

Die molare Zuckerzusammensetzung beider Fällungsprodukte im Neutralzuckeranteil ergab ein ähnliches Arabinose/Glucose/Galaktose - Verhältnis. Das Rohpolysaccharid der 1 + 1 Fällung enthielt doppelt soviel Rhamnose wie die 1 + 4 Fraktion; Xylose und Mannose ließen sich jeweils nur in geringen Anteilen nachweisen.

Erhebliche Unterschiede zeigten beide Rohpolysaccharide jedoch in ihrem Uronsäure- und Proteingehalt. Während sich bei der 1 + 1 Fraktion mit 33,9 % ein relativ hoher Anteil an sauren Zuckern erkennen ließ, ergab sich für das 1 + 4 Fällungsprodukt nur ein halb so großer Wert. Umgekehrt enthielt das Rohpolysaccharid der 1 + 4 Fällung mehr als fünfmal soviel Protein wie die mit niedrigerer Alkoholkonzentration gewonnene Fraktion.

Da das 1 + 1 Rohpolysaccharid in mehr als doppelt so hoher Ausbeute zur Verfügung stand, konzentrierten wir uns bei der weiteren Aufarbeitung auf diese Fraktion.

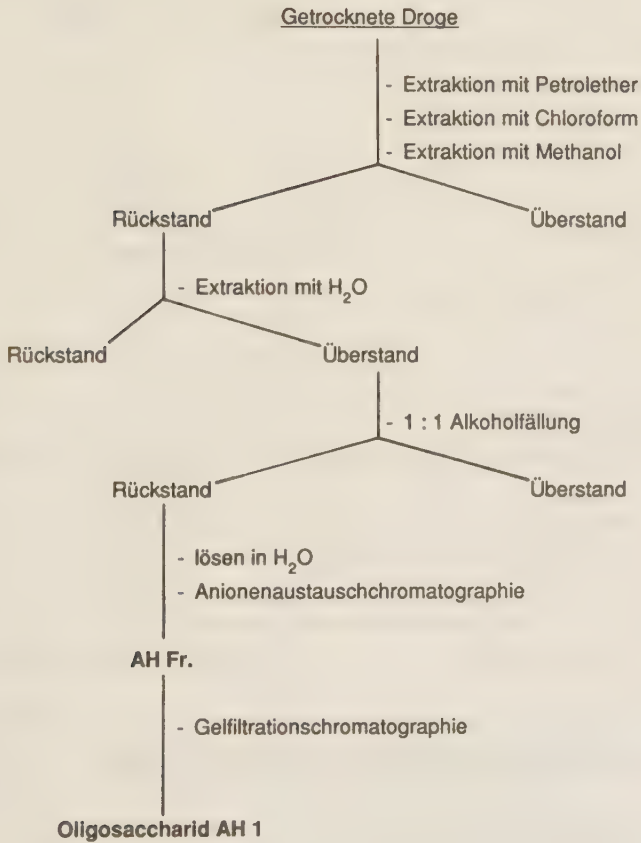


Abb. 20:

Isolierungsschema des Oligosaccharides AH 1 aus *Arnicae montanae L. herba*

Tabelle 18: Zuckeranalysen und Ausbeuten der Rohpolysaccharidfraktionen

	1 + 1 Fällung	1 + 4 Fällung
Molare Zuckerzusammensetzung:		
Rhamnose	0,44	0,22
Arabinose	0,65	0,67
Xylose	0,07	0,23
Mannose	0,08	0,14
Galaktose	1,0	1,0
Glucose	0,33	0,48
Uronsäuregehalt		
nach BITTER u. MUIR (1962):	33,9 %	16,3 %
Proteingehalt		
nach LOWRY (1951):	7,5 %	42,7 %
Ausbeuten*:	0,74 %	0,29 %

* bezogen auf die getrocknete Droge

2.3. Darstellung der Einzelkomponente AH 1 aus der 1 + 1 Fällung

2.3.1. Anionenaustauschchromatographie

Als ersten Schritt zur Auftrennung dieser Fraktion führten wir eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B durch. Mit destilliertem Wasser eluierten wir von der in der Acetatform vorliegenden Säule eine nach UV-Detektion relativ inhomogene Neutralfraktion. Anschließend erhielten wir mit einem 0 - 1 M NaCl-Gradienten drei saure Hauptfraktionen bei Kochsalzkonzentrationen von 0,16 bis 0,21 M, 0,21 bis 0,26 M und 0,26 bis 0,36 M und erkannten nach Polarimeterdetektion zusätzlich drei Nebenfraktionen.

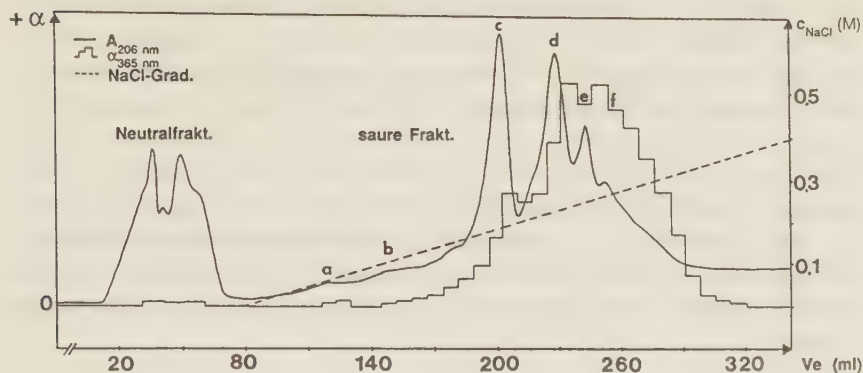


Abb. 21: Anionenaustauschchromatographie der 1 + 1 Fällung

Tabelle 19: Zuckeranalysen und Ausbeuten der Anionenaustauscherfraktionen der 1 + 1 Fällung

		Fraktionen					
	neutral	sauer (a - f)					
		a	b	c	d	e	f
Molare Zuckerzusammensetzung:							
Rhamnose	Spuren	0,03	0,05	0,11	0,71	1,80	0,12
Arabinose	0,37	0,31	0,40	0,50	0,91	0,77	0,46
Xylose	0,03	0,06	0,08	0,05	0,08	---	0,03
Mannose	0,06	0,04	0,05	0,07	---	0,14	0,18
Galaktose	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glucose	0,80	0,40	0,17	0,28	0,26	0,55	0,53

Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962):	7,9 %	23,3 %	31,1 %	48,4 %	66,5 %	52,8 %	8,9 %
--	-------	--------	--------	--------	--------	--------	-------

Proteingehalt nach LOWRY (1951):	5,3 %	5,6 %	4,1 %	2,9 %	1,5 %	1,6 %	23,7 %
-------------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------

Ausbeuten*:	1,9 %	2,0 %	4,7 %	8,9 %	14,1 %	23,7 %	1,5 %
-------------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	-------

* bezogen auf die 1 + 1 Fällung

Das molare Verhältnis der Neutralzucker, bezogen auf die quantitativ am häufigsten vertretene Galaktose, zeigte bei den einzelnen Fraktionen nur geringfügige Differenzen. Die höchsten Rhamnose- und Arabinosewerte fanden sich bei den Fraktionen d und e, während sich die Neutralfraktion durch einen erhöhten Glucosegehalt unterschied.

Die prozentualen Anteile an Uronsäure nahmen bis zu Fraktion d mit einem Wert von 66,5 % kontinuierlich zu, sanken dann jedoch wieder. Umgekehrt verhielten sich die Ergebnisse der Proteinbestimmung. Hier konnte für Fraktion d mit 1,5 % ein Minimum ermittelt werden, während Fraktion f mit 23,7 % den höchsten Gehalt aufwies.

Fraktion d mit dem höchsten Uronsäuregehalt wurde weiterverarbeitet.

2.3.2. Gelfiltrationschromatographie

Zur weiteren Reinigung verwendeten wir das Gelmaterial Fraktogel TSK-HW 50 (S) mit einem neutralen 0,05 M Phosphatpuffer als Eluens, der 0,15 M Kochsalz enthielt. Den nach UV-, Refraktometer- und Polarimeterdetektion deutlich erkennbaren Hauptpeak rechromatographierten wir anschließend an demselben Gel und prüften die Einheitlichkeit von AH 1 dann in einem HP-GPC-System.

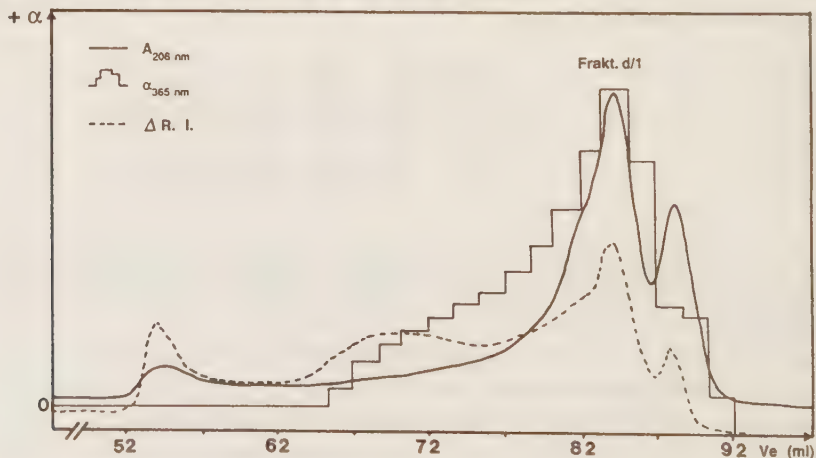


Abb. 22: Gelchromatographie der Fraktion d an Fraktogel TSK-HW 50 (S)

2.4. Prüfung von AH 1 auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung

2.4.1. HP-GPC-Chromatographie

Die Überprüfung der Homogenität von AH 1 gelang mit der HP-GPC-Methode. In einem 0,2 molaren Puffersystem erhielten wir ein sehr symmetrisches und scharfes Elutionsprofil, aus dem auf eine homogene Verbindung mit einem sehr engen Molekulargewichtsbereich geschlossen werden konnte.

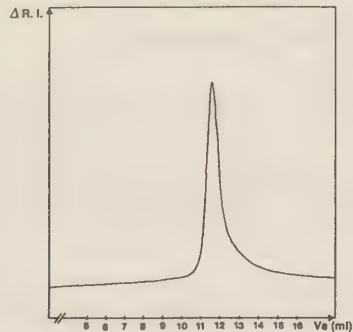


Abb. 23: HP-GPC-Chromatogramm des Oligosaccharides AH 1

2.4.2. Molekulargewichtsbestimmung

Für die Bestimmung des Molekulargewichtes von AH 1 setzten wir die Porasil GPC 60 Säule und den bereits bei der Homogenitätsprüfung als Eluens beschriebenen Phosphatpuffer ein. Die Eichung des Systems erfolgte mit Glucose, Maltotriose, Maltoheptaose, Dextransulfat 5000 sowie den Dextranen 10 T und 40 T. Aus dem Elutionsvolumen ermittelten wir ein mittleres Molekulargewicht von 1.800 D.

Tabelle 20: Molekulargewichtsbestimmung von AH 1

Säulensystem: μ -Porasil GPC 60

Puffersystem: 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,0 + 0,15 M NaCl

AH 1

M_w 1.800 D

2.5. Partielle Charakterisierung des Oligosaccharides AH 1

2.5.1. Optische Drehung

Die nach DAB 9 durchgeführte Bestimmung der optischen Drehung ergab für das Oligosaccharid AH 1 einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +159^\circ$.

2.5.2. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

Zur qualitativen Bestimmung der Zuckerzusammensetzung hydrolysierten wir AH 1 mit 2 M Trifluoressigsäure 90 Minuten bei 121° C im Trockenschrank und untersuchten das Hydrolysat anschließend dünnschichtchromatographisch. Im Chromatogramm ließ sich nur eine einzige Bande in Höhe der Galakturonsäure - Vergleichslösung detektieren.

Die Proteinbestimmung nach LOWRY erbrachte keinen Hinweis auf möglicherweise vorhandenes Protein.

Um eventuell vorliegende, aufgrund sehr geringer Konzentrationen dünnschichtchromatographisch nicht erfaßbare Mengen an Neutralzuckern zu erkennen, derivatisierten wir nach Totalhydrolyse von AH 1 die Zucker zu den entsprechenden Alditolacetaten und untersuchten die Lösung gaschromatographisch. Uronsäuren können mit dieser Methode nicht bestimmt werden (BLAKE *et al.* 1968, BLAKE *et al.* 1970, NELSON *et al.* 1978), da sie nicht in Alditolacetate sondern in Aldonolactone und deren Dehydratisierungsprodukte übergeführt werden. Die Anwesenheit von Neutralzuckern ließ sich auch mit dem Gaschromatographen nicht nachweisen.

Bei der Ermittlung des Uronsäuregehaltes erhielten wir für AH 1 einen Wert von 100 %, so daß bei dieser Struktur auf das Vorliegen eines Oligogalakturonans geschlossen werden konnte.

Tabelle 21: Zuckeranalyse des Oligosaccharides AH 1

 Neutralzucker:

 Urnsäuregehalt
nach BITTER u. MUIR (1962):

100 %

 Proteingehalt
nach LOWRY (1951):

2.5.3. Pektinaseabbau

Im allgemeinen enthalten Pektine in ihren Hauptketten neben geringeren Anteilen an Rhamnoseresen α -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpfte Galakturonsäureeinheiten, deren Carboxylgruppen oft zu einem erheblichen Prozentsatz mit Methanol verestert vorliegen (STEPHEN 1983c). Ein enzymatischer Abbau der nach alkalischer Esterhydrolyse freiwerdenden Pektinsäure mit Pektinase kann als Hinweis auf das Vorliegen des sauren Zuckers in dieser Bindungsart gelten.

Dünnschichtchromatographisch ließ sich eine deutliche Zone in Höhe der Galakturonsäurevergleichslösung erkennen.

2.5.4. Reduktion der Galakturonsäure

Vor der Methylierungsanalyse reduzierten wir die Galakturonsäurereste nach der von TAYLOR und CONRAD (1972) beschriebenen Methode mit Natriumborodeuterid. Die Menge an nicht umgesetzter Urnsäure im carboxylreduzierten Oligosaccharid AH 1R bestimmten wir nach zweimaliger Reduktion mit 15 % (BITTER *et al.* 1962).

2.5.5. Methylierungsanalyse des reduzierten Oligosaccharides AH 1R

Zur Klärung der Bindungsverhältnisse der Galakturonsäure methylierten wir nach HAKOMORI (1964). Die erhaltenen, partiell methylierten Alditolacetate wurden durch Vergleiche mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976) sowie anhand der relativen Retentionszeiten zugeordnet.

Das Chromatogramm wies ein hohes Grundrauschen auf. Als Ursache vermuteten wir niedermolekulare Produkte der Carbodiimid Reaktion, die sich normalerweise problemlos mittels Gelchromatographie an Biogel P 2 von den hier im Ausschlußvolumen eluierten reduzierten Polysacchariden abtrennen lassen. Das reduzierte Oligosaccharid AH 1R wurde jedoch aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes ebenfalls teilweise im von 100 D bis 1.800 D reichenden Fraktionierungsbereich der Säule eluiert, so daß keine völlige Abtrennung der Verunreinigungen erfolgt war.

Peak 1 identifizierten wir als 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol-6,6-d₂. Die charakteristischen Fragmente *m/e* 207, 163 und 147 wiesen eindeutig auf den doppelten Deuteriumeinbau in Position C-6 dieser ehemaligen terminalen Uronsäure hin.

Peak 4 wurde als 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-galaktitol-6,6-d₂ erkannt. Die Bruchstücken *m/e* 115, 175 und 235 deuteten wiederum auf den doppelten Deuteriumeinbau in Position C-6 hin. Diesem Derivat mußte eine ehemals (1→4)-gebundene Galakturonsäure zugrundeliegen.

Bei den beiden nicht zuzuordnenden Peaks 2 und 3 handelt es sich möglicherweise um Abbauprodukte nicht reduzierter Galakturonsäuren.

Auch nach Absuchen des gesamten Chromatogramms nach den für Verzweigungsstellen der Galakturonsäure typischen Fragmenten durch "selected ion monitoring" fanden sich keine entsprechenden Bruchstücke, so daß AH 1R nur aus einer linearen Kette bestehen mußte.

Das molare Verhältnis von terminaler zu kettenständiger Galakturonsäure betrug 1 : 7. Dies bedeutet, daß das Molekül aus etwa acht Galakturonsäureeinheiten besteht und ein etwas kleineres Molekulargewicht als mit der GPC ermittelt besitzt.

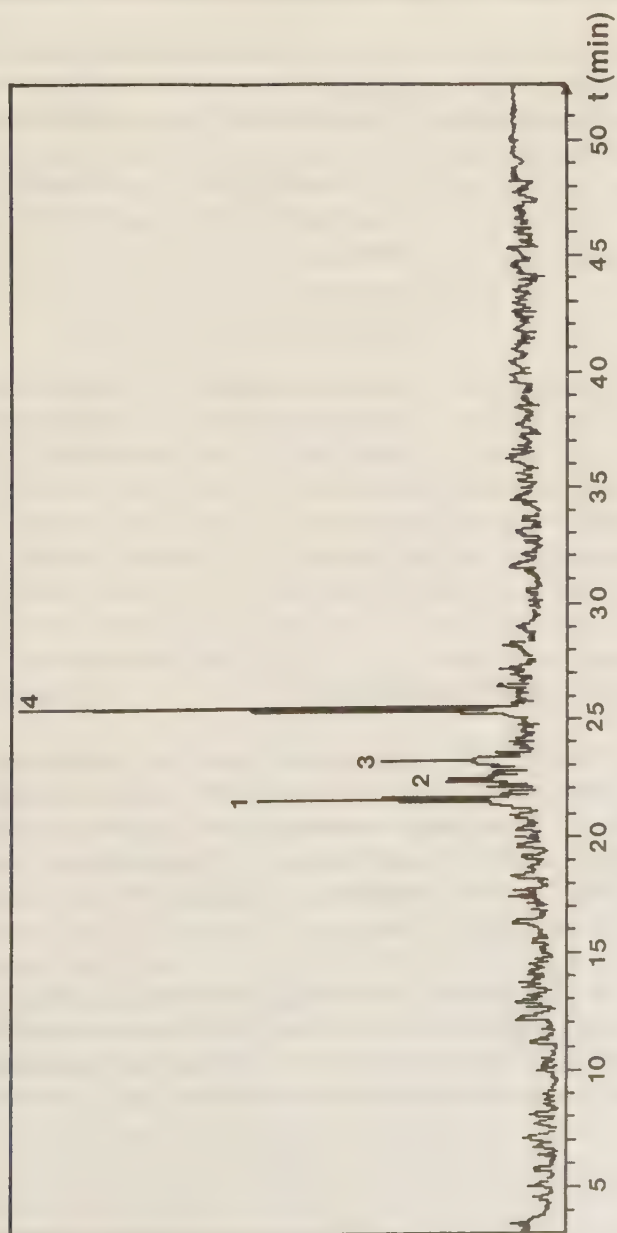


Abb. 24: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des reduzierten Oligosaccharides AH 1R

Tabelle 22: Methylierungsanalyse des carboxylreduzierten Oligosaccharides AH 1R

Peak	molare Zusammensetzung*	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke
1	1,0	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 117, 131, 147, 161, 163, 207
2	---	nicht zuzuordnen	
3	---	nicht zuzuordnen	
4	6,9	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 115, 117, 129, 133, 161, 175, 235

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

2.5.6. ¹³C-NMR-Spektroskopie von AH 1

Zur Aufnahme des ¹³C-NMR-Spektrums stand uns nur eine sehr geringe Substanzmenge zur Verfügung. Die Messung erfolgte bei 50° C, um die Interpretation der sich schlecht vom Grundrauschen abhebenden Signale zu erleichtern. Als Erklärung hierfür gelten die längeren Korrelationszeiten der häufig geordneten Strukturen bei Polymeren und die damit verbundenen erniedrigten Spin-Spin-Relaxationszeiten einzelner Kerne, die eine Linienverbreiterung zur Folge haben (REES *et al.* 1982).

Da wir in der Literatur keine geeigneten Vergleichswerte von Modellverbindungen fanden, zogen wir zur Interpretation die Daten von Galakturonsäure (JAQUES *et al.* 1979), dem Zuckerrübenpektin (KEENAN *et al.* 1985) und von Oligosacchariden aus Schleimen von Vertretern der Familie der Malvaceae (SHIMIZU *et al.* 1985) heran.

Bei 173,7 ppm und 170,78 ppm ließen sich zwei stark zu tieferem Feld verschobenen Signale erkennen. Nachdem sich keine Resonanzen im Bereich um 20 ppm fanden, wie sie bei einer Veresterung mit Essigsäure für O-COCH_3 erscheinen müßten, durften diese Signale den C-6 Atomen freier und mit Methanol veresterter Galakturonsäure zugeordnet werden. Sie lagen in guter Übereinstimmung mit den von JAKUES für Galakturonsäure mit 174,01 ppm und von KEENAN für das Zuckerrübenpektin mit 174,0 ppm bzw. 171,0 ppm gefundenen Werten. Das Methanolsignal bei KEENAN fand sich bei 53,4 ppm, während das Spektrum von AH 1 mit einer Resonanz bei 52,89 ppm auf eine Veresterung mit diesem Alkohol hinwies.

Die Signale bei 100 ppm im Bereich der anomeren Kohlenstoffe entsprechen der α -Galakturonsäure in Pyranoseform, wobei die Resonanz bei 100,17 ppm gut mit dem von SHIMIZU beschriebenen Wert von 100,57 ppm für terminale α -Galakturonsäure korreliert. Die etwas zu höherem Feld verschobenen Signale zwischen 99,46 und 99,67 ppm stammten wahrscheinlich von anomeren Kohlenstoffatomen kettenständiger Uronsäuren. Ähnliche Verschiebungen ließen sich auch bei kettenständigen Resten anderer Zucker im Vergleich zu ihren terminalen Einheiten beobachten (SHASHKOV *et al.* 1976). Dem Kohlenstoffatom C-1 des reduzierenden Endes könnte die Resonanz bei 92,33 ppm zugeschrieben werden. BOCK und Mitarbeiter (1983) erhielten hierfür bei freier Galakturonsäure einen Wert von 93,2 ppm.

Für die Interpretation des nicht anomeren Bereiches erwähnt KENNAN eine Untersuchung an einem bei der Fa. Sigma erhältlichen (1 $\rightarrow$ 4)- α -Galakturonan, bei dem das Signal der in Position C-4 glykosidierten Galakturonsäure bei 79,2 ppm lag und mit dem von ihm ebenfalls untersuchten Zuckerrübenpektin übereinstimmte. In guter Korrelation hierzu befinden sich im Spektrum von AH 1 die zwei Signale bei 79,16 ppm und 78,53 ppm, wobei letzteres der am reduzierenden Ende gebundenen Galakturonsäure zugeschrieben werden könnte. Eine schwache Resonanz bei 73,85 ppm steht in Übereinstimmung mit einem von SHIMIZU beschriebenen Signal von 73,94 ppm für ein C-4 Kohlenstoffatom einer am nichtreduzierenden Ende gebundenen terminalen Galakturonsäure.

Die sich teilweise überlagernden Signale der Kohlenstoffe C-2, C-3 und C-5 im Bereich von 68 ppm bis 72 ppm erschwerten eine eindeutige Interpretation. Gestützt auf die Literaturdaten ließen sich die Signale 70,92 ppm, 71,5 ppm und 72,17 ppm den Kohlenstoffen in Position C-2, C-3 und C-5 der terminalen Galakturonsäure am

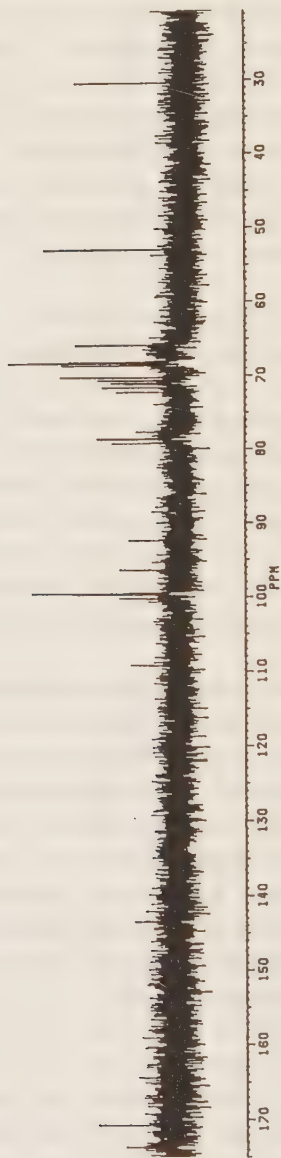


Abb. 25: ^{13}C -NMR-Spektrum des Oligosaccharides AH 1

nichtreduzierenden Ende zuordnen, während bei (1→4)- α -gebundener Galakturonsäure Resonanzen bei 70,92 ppm, 71,03 ppm und 72,17 ppm von diesen Kohlenstoffen stammen dürften. Für die entsprechenden C-Atome der am reduzierenden Ende gebundenen Galakturonsäure konnte eine Zuordnung der Signale bei 68,12 ppm, 68,56 ppm und 71,53 ppm erfolgen.

Ein von SHIMIZU für (1,3,4)- α -verknüpfte Galakturonsäure gefundenes Signal des glykosidierten C-3 Atoms bei 81,76 ppm ließ sich in unserem Spektrum nicht erkennen. Das Vorliegen dieser Verzweigungsstelle ist deshalb auszuschließen.

Das starke Signal bei 30,27 ppm findet mit den Ergebnissen der bisherigen Diskussion keine Erklärung. Eine im Spektrum des Zuckerrübenpektins erscheinende ebenso deutliche Resonanz an derselben Stelle wurde von KEENAN nicht interpretiert. ROMBOUTS und Mitarbeiter (1986), die die Struktur dieser Verbindung mittels enzymatischer und chemischer Abbaureaktionen näher untersuchten, fanden neben Acetyl- und Methyl- auch Feruloylgruppen, für deren Vorhandensein unser Spektrum z. B. im Bereich der Aromatensignale jedoch keinerlei Anhaltspunkte lieferte.

BOCK und Mitarbeiter (1983) verzeichnen in einer Auflistung der ^{13}C -NMR-Daten von Methyl-deoxypyranosezuckern nach Wegfall der OH-Gruppe deutliche Verschiebungen der entsprechenden Kohlenstoffsignale zu höherem Feld. So fallen beispielsweise die Resonanzen der C-2 und C-3 Kohlenstoffe einer β -2,3-Dideoxy-erythrohexopyranose bei 30,3 ppm zusammen. Andere, für diesen Zucker charakteristische Signale bei 103,5 ppm für das C-1 Atom oder 80,6 ppm für das Kohlenstoffatom C-5 fehlen aber in unserem Spektrum.

Möglicherweise handelt es sich deshalb bei der Resonanz von 30,27 ppm um eine Verunreinigung, wie sie etwa durch die beiden Methyl-Kohlenstoffe von Aceton bei 30,1 ppm hervorgerufen werden kann (WILLIAMS *et al.* 1985), dessen Carbonylsignal oberhalb von 200 ppm zudem oft recht schwach erscheint und bei uns eventuell im Grundrauschen unterging. Zu den Verunreinigungen dürften auch die Signale bei 96,32 ppm und 109,14 ppm zählen, obwohl letzteres auf das anomere Kohlenstoffatom einer terminalen α -Arabinofuranose hinweist. Da im Gaschromatogramm der Neutralzuckerbestimmung jedoch nicht einmal Spuren dieses Neutralzuckers nachgewiesen werden konnten, halten wir das Vorliegen dieses Zuckers für sehr unwahrscheinlich.

Tabelle 23: ^{13}C -NMR-Daten des Oligosaccharides AH 1 im Vergleich zu Galakturonsäure (JAQUES *et al.* 1979), dem Pektin aus Zuckerrüben und einem (1→4)- α -Galakturonan der Fa. Sigma (KEENAN *et al.* 1985) sowie einem Oligosaccharid aus Schleimen von Vertretern der Familie der Malvaceae (SHIMIZU *et al.* 1985)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm						MeO
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
Galakturonsäure nach JAQUES	93,54	68,99	69,82	71,23	71,34	174,01	---
(1→4)- α -Galakturonan der Fa. Sigma nach KEENAN	100,6	n. z.	n. z.	79,2	n. z.	174,0	---
terminale Galakturonsäure am reduzierenden Ende in AH 1	92,33	68,12	68,56	78,53	71,53	n. z.	---
terminale Galakturonsäure am <u>nicht</u> reduzierenden Ende von AH 1	100,17	70,92	71,5	73,85	72,17	n. z.	---
Oligosaccharid nach SHIMIZU	100,56	69,78	81,76	77,82	72,01	174,88	---
(1→4)- α -Galakturonsäure in AH 1	99,46-66	70,92	71,03	79,17	72,17	n. z.	---
Signale für C-6 im Zuckerrübenpektin nach KEENAN, frei	---	---	---	---	---	174,0	---
mit MeOH verestert	---	---	---	---	---	171,0	53,4
Signale für C-6 in AH 1, frei	---	---	---	---	---	173,7	---
mit MeOH verestert	---	---	---	---	---	170,78	52,89

n. z.: nicht zugeordnet

2.5.7. Bestimmung des Veresterungsgrades

Die genaue Bestimmung des Veresterungsgrades mit Methanol führten wir wiederum nach der schon früher beschriebenen Methode durch (WOOD *et al.* 1971).

Für das Oligosaccharid AH 1 ergab sich ein Methoxylgehalt von 9,5 %, der einem Veresterungsgrad der Carboxylgruppen der Galakturonsäuren von 58,3 % entsprach. Dieser Wert stand in guter Übereinstimmung mit dem aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum abgeschätzten Veresterungsgrad. Hier verhielten sich die Intensitäten der C-6 Signale von freier zu veresterter Galakturonsäure wie 1 : 2.

2.6. **Diskussion der chemisch-physikalischen Untersuchungen an einem Oligosaccharid aus *Arnica montana* L.**

Das Oligosaccharid AH 1 mit einem Molekulargewicht von 1.800 D läßt sich in die Gruppe der Homogalakturonane einordnen (McNEIL *et al.* 1984). Es verfügt über eine unverzweigte Struktur und setzt sich aus (1→4)- α -verknüpften Galakturonsäureresten zusammen. Etwa 60 % der Carboxylgruppen liegen mit Methanol verestert vor.

Nach den Ergebnissen der Methylierungsanalyse scheint ein Gerüst aus 8 Zuckern mit fünffacher Veresterung denkbar. Eine derartige Verbindung besäße ein Molekulargewicht von 1.496 D.

Die Tatsache, daß ein Oligosaccharid mit einem so niedrigen Molekulargewicht unter den obigen Bedingungen überhaupt isolierbar war, dürfte auf die bei galakturonsäurereichen Verbindungen öfters beobachtete Aggregation zurückzuführen sein (ROMBOUTS *et al.* 1986, McNEIL *et al.* 1984). Wahrscheinlich ist hierin auch der Grund zu sehen, daß kein totaler Verlust von AH 1 während der Dialysen auftrat.

Ähnliche Oligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad von 15 und höher ließen sich nach saurer Partialhydrolyse aus den Zellwänden von Sycamore-Zellkulturen freisetzen (NOTHNAGEL *et al.* 1983), fanden sich aber ebenfalls sowohl im Nährmedium dieser Zellen (McNEIL *et al.* 1984) als auch in demjenigen von Tabak-Zellkulturen (YAMAOKA *et al.* 1977). Das Homogalakturonan des Sycamore-Zellme-

diums wies dabei einen Galakturonsäuregehalt von 95 %, dasjenige von Tabak einen Wert von 87 % auf. Alternierende alkalische und saure Extraktionen führten zur Isolierung eines Homogalakturonans aus den Zellwänden von Rosa-Zellkulturen mit einem Polymerisationsgrad von über 100 (CHAMBAT *et al.* 1980).

D. POLYSACCHARIDE AUS ARNICA MONTANA L. ZELLKULTUREN

1. Produktion nieder- und höhermolekularer Verbindungen durch pflanzliche Zellkulturen

Autonomie und **Totipotenz** kennzeichnen als grundlegende Eigenschaften alle Pflanzenzellen. Auf diese Merkmale läßt sich das Charakteristikum zurückführen, daß aus intakten Pflanzen entnommene und in speziellen Nährmedien kultivierte Zellen sich zwar durch Teilung vermehren, jedoch keiner Differenzierung unterliegen. Trotzdem verfügt jede einzelne Zelle über die gesamte genetische Information, um unter geeigneten Bedingungen wieder eine vollständige Pflanze zu bilden (ZENK 1982).

Erste Versuche zur Herstellung von Pflanzenstoffen über Gewebekulturen liegen schon mehr als 20 Jahre zurück. Bisher gelang es auf diese Weise vor allem, einige niedermolekulare Verbindungen wie Rosmarinsäure, Ajmalin, Ubichinon, Shikimisäure oder Shikonin in guter Ausbeute zu produzieren. Die Gewinnung sekundärer Inhaltsstoffe aus Pflanzenzellen auf ökonomische Weise in einer industriell interessanten Größenordnung beschränkt sich bisher jedoch auf wenige Produkte (MISAWA 1977, ZENK 1978, HAHLBROCK *et al.* 1979).

Neben Enzymen zählen Proteine und Polysaccharide zu den aus pflanzlichen Zellkulturen isolierbaren höhermolekularen Verbindungen. Bereits Mitte der Sechziger Jahre berichteten KIKUMOTO und Mitarbeiter von der Isolierung eines Glucans aus dem Nährmedium der Basidiomycete *Schizophyllum commune* (FUJIMOTO *et al.* 1964, KIKUMOTO *et al.* 1965), das den Namen Schizophyllan erhielt und stark antitumorale Eigenschaften besitzt (KOMATSU *et al.* 1969). Anschließend gelang ALBERSHEIM und Mitarbeitern durch Anlage von Sycamore-Suspensionskulturen (*Acer Pseudoplatanus*) auch die Isolierung und Strukturaufklärung von Polysacchariden aus Zellkulturen höherer Pflanzen (TALMADGE *et al.* 1973, BAUER *et al.* 1973, KEEGSTRA *et al.* 1973). Von den in der Literatur von diesem Zeitpunkt an immer häufiger auftauchenden Hinweisen auf die Isolierung von Polysacchariden aus Zellkulturen seien an dieser Stelle nur beispielhaft die Arbeiten über *Phaseolus vulgaris* (WILDER *et al.*

1973) und *Nicotiana tabacum* (AKIYAMA *et al.* 1981) erwähnt. Kürzlich isolierten WAGNER und Mitarbeiter ein Fucogalaktoxyloglucan und ein saures Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* Zellkulturen (WAGNER *et al.* 1988b).

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Anlage von Arnica montana L. Zellkulturen*

Blatt- und Stengelteile von *Arnica montana* L. Pflanzen aus dem Botanischen Garten in München wurden mit 2 % NaOCl 3 bis 60 Minuten sterilisiert und anschließend auf festen LS oder DAX Nährböden zur Kallusbildung angeregt. Nach etwa zwei Wochen bildete sich der erste Kallus, wobei sich das LINDSMAIER-SKOOOG (LS) Medium als geeigneter erwies (LINDSMAIER *et al.* 1965). Nach Etablierung der Kalli erfolgte ihre Übertragung in flüssiges Nährmedium.

Die Produktion der flüssigen Suspensionskulturen fand in 1 l Erlenmeyerkolben mit 250 ml LS-Nährmedium statt. Nach Ablauf von ca. zwei Wochen filtrierten wir die Zellen ab und "ernteten" so die im Nährmedium vorhandenen Polysaccharide.

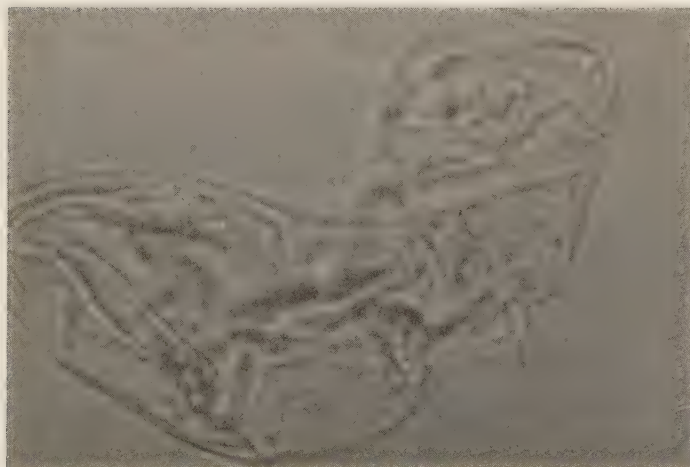


Foto 3: *Arnica montana* L. Zellkulturen

*Die Arnica montana Zellkulturen wurden von Prof. Dr. M. H. Zenk, Institut f. Pharmazeutische Biologie, München, zur Verfügung gestellt.

2.2. Isolierung und Fraktionierung von Rohpolysaccharidfraktionen

Die filtrierte Nährlösung versetzten wir mit der dreifachen Menge Ethanol und lösten das ausgefallene Material anschließend wieder in Wasser. Zur Entfernung von Proteinanteilen fügten wir daraufhin Trichloressigsäure zu und fällten aus dem klaren Überstand das Rohpolysaccharidgemisch wieder aus. Nach Auflösung in 0,2 %iger Natriumacetat-Lösung lieferte die Zugabe von 1/2, 1, 2 und 4 Volumenteilen Alkohol vier verschiedene Rohpolysaccharidfraktionen, wie in Abbildung 26 dargestellt.

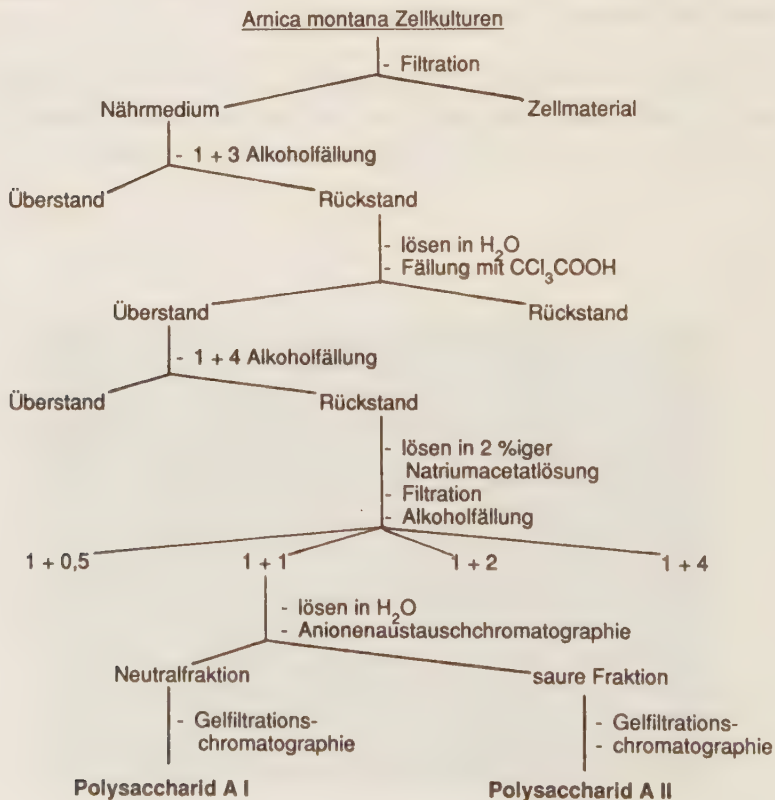


Abb. 26: Isolierungsschema der Polysaccharide A I und A II aus dem Nährmedium von *Arnica montana* L. Zellkulturen

Tabelle 24: Zuckeranalysen und Ausbeuten der Rohpolysaccharidfraktionen

	1 + 0,5	1 + 1	1 + 2	1 + 4
Molare Zuckerzusammensetzung:				
Fucose	0,19	0,17	0,09	0,01
Arabinose	0,17	2,08	1,09	0,46
Xylose	0,77	0,67	0,35	0,12
Mannose	---	0,08	0,37	0,55
Galaktose	0,34	2,54	1,49	0,52
Glucose	1,0	1,0	1,0	1,0
Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962):				
	16,8 %	20,6 %	17,4 %	13,3 %
Proteingehalt nach LOWRY (1951):				
	5,60 %	7,95 %	4,35 %	5,60 %
Ausbeuten*:				
	1,00 %	0,83 %	0,94 %	0,09 %

* bezogen auf 100 g gefriergetrocknetes Zellmaterial

Die 1 + 0,5, 1 + 1 und 1 + 2 Fällungsprodukte ließen sich in etwa gleichen Anteilen von 0,8 bis 1 % gewinnen, während jene Fraktion aus der Fällung mit der höchsten Alkoholkonzentration nur in geringen Mengen anfiel.

Qualitativ ließen sich in allen Fraktionen Fucose, Arabinose, Xylose, Galaktose und Glucose nachweisen. Mannose fanden wir im 1 + 0,5 Fällungsprodukt nicht; sie trat jedoch in allen anderen Rohpolysacchariden auf.

Die molare Zuckerzusammensetzung der einzelnen Fraktionen zeigte ein recht unterschiedliches Bild. Während das 1 + 0,5 Fällungsprodukt größere Mengen an Xylose und Glucose aufwies, traten diese Zucker in der 1 + 1 Fraktion zugunsten von Arabinose und Galaktose mengenmäßig zurück. Diese dominierten auch im 1 + 2 Rohpolysaccharid. Die mit der höchsten Alkoholkonzentration (1 + 4) gewonnene Fraktion setzte sich neben der dominierenden Glucose zu etwa gleichen Anteilen aus Arabinose, Galaktose und Mannose zusammen.

Der Uronsäuregehalt bewegte sich zwischen ca. 13 und etwa 20 %, wobei der höchste Wert in der 1 + 1 Fraktion auftrat. Diese wies, trotz vorangegangener Trichloressigsäurefällung, mit knapp 8 % noch immer einen ungewöhnlich hohen Proteingehalt auf.

2.3. Darstellung der Einzelkomponente A I und A II aus der 1 + 1 Fällung

2.3.1. Anionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Auftrennung der einzelnen Fraktionen setzten wir wieder die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B ein. Hierbei zeigte das Chromatogramm der 1 + 1 Fällung nach Elution mit Wasser eine in einem sehr symmetrischen Peak eluierte Neutralfraktion, der sich nach Wechsel des Elutionsmittels (linearer 0 bis 1 M Kochsalzgradient) eine zweite, ebenfalls in einem einzigen symmetrischen Peak chromatographierte saure Fraktion in einem Bereich von 0,02 bis 0,16 M NaCl anschloß.

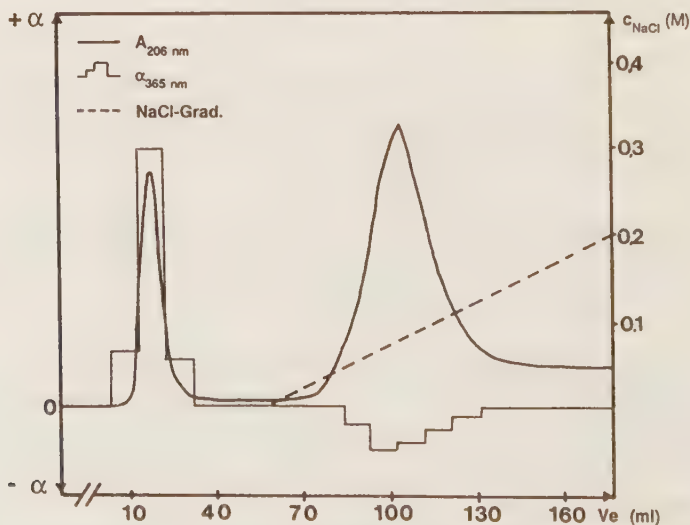


Abb. 27: Anionenaustauschchromatographie der 1 + 1 Fällung

Nachdem die 1 + 1 Fraktion offenbar nur aus zwei Polysaccharidtypen bestand, die sich mit dem Ionenaustauscher problemlos trennen ließen, die Elutionsprofile der anderen Fällungen jedoch, entsprechend ihrer wesentlich komplexeren Zusammensetzung ein heterogeneres Bild lieferten, wählten wir zur weiteren Aufarbeitung das 1 + 1 Fällungsprodukt aus.

2.3.2. Gelfiltrationschromatographie

Zur Abtrennung eventuell doch vorhandener Begleitsubstanzen unterwarfen wir die neutrale und die saure Fraktion nacheinander einer Gelchromatographie an Sephacryl S-400- und Sephacryl S-300-Gelmaterial, wobei wir jedesmal mit 0,2 M Kochsalzlösung eluierten. In diesen Säulensystemen erhielten wir für beide Fraktionen über UV- und Refraktometerdetektion sowie Messung der optischen Aktivität jeweils völlig symmetrische Peaks, wobei wir bei Chromatographie an Sephacryl S-400 die Abtrennung nur jeweils geringer Anteile niedermolekularer Verunreinigungen beobachteten. Die Überprüfung der Einheitlichkeit der beiden Polysaccharide A I und A II erfolgte anschließend mit Hilfe eines HP-GPC-Systems.

2.4. **Prüfung der Polysaccharide A I und A II auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung**

2.4.1. HP-GPC-Chromatographie

Zur Prüfung der beiden Polysaccharide auf Homogenität setzten wir wieder die HP-GPC Methode ein. Mit einem 0,2 M Natriumphosphatpuffersystem erhielten wir ein sehr symmetrisches Elutionsprofil für A I und ein völlig symmetrisches für A II, so daß beide Polysaccharide als chemisch einheitliche Verbindungen angesehen werden konnten.

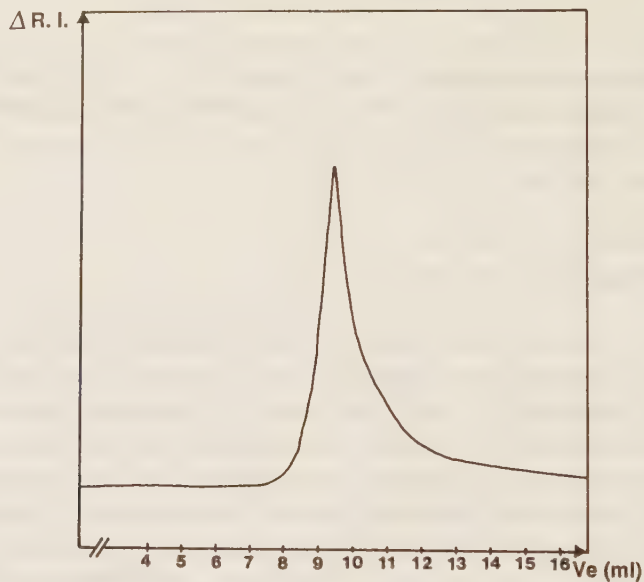


Abb. 28: HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides A I

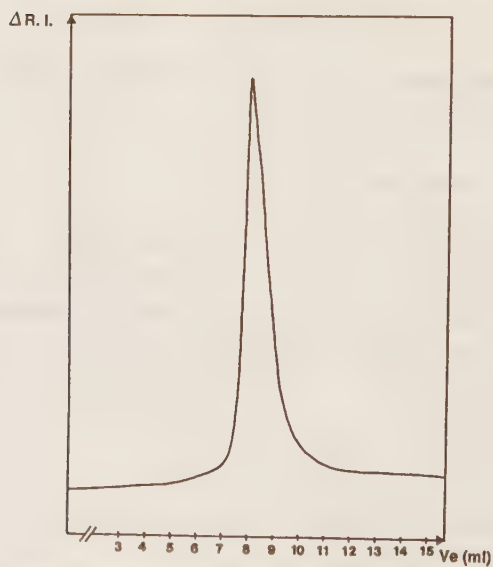


Abb. 29: HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides A II

2.4.2. Molekulargewichtsbestimmung

Für die über HP-Gelpermeationschromatographie durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung setzten wir nach steigenden Ausschlußvolumina in Reihe geschaltete μ -Bondagel E-125 und μ -Bondagel E-500 Säulen ein, wodurch das Gesamtsystem einen Trennbereich von 2.000 D bis 500.000 D erhielt. Nach Eichung mit Glucose und den Dextranen 10 T, 40 T, 70 T, 110 T, 500 T und 2.000 T ermittelten wir in einem 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 die in Tabelle 25 wiedergegebenen Molekulargewichte.

Tabelle 25: Molekulargewichtsbestimmung der Polysaccharide A I und A II

Säulensystem: μ -Bondagel E-125 + μ -Bondagel E-500		
	A I	A II
	M_w	
Puffersysteme:		
0,2 M Natriumphosphat pH 6,0	22.500 D	100.000 D
0,05 M Natriumphosphat pH 7,0 + 0,15 M NaCl + 10 % DMSO	n. b.	95.000 D
0,05 M Natriumphosphat pH 7,0 + 0,15 M NaCl + 20 % DMSO	n. b.	95.000 D
0,2 M Natriumacetat pH 4,0 + 0,2 M NaCl	n. b.	90.000 D
30 % (G/G) Ethanol	n. b.	nicht auszuwerten

n. b.: nicht bestimmt

Da saure Polysaccharide oft die Tendenz zur Aggregation zeigen (McNEIL *et al.* 1984, KIYOHARA *et al.* 1986), untersuchten wir das Verhalten von A II bei Verwendung unterschiedlicher Elutionsmittel.

Zusätze von Dimethylsulfoxid in Konzentrationsbereichen von 10 und 20 % zu einem 0,2 M Posphatpuffersystem führten nur zu einer geringen Erniedrigung des Molekulargewichtes. Der Einfluß höherer Konzentrationen ließ sich aufgrund der dann präzipitierenden Polysaccharide nicht feststellen.

Eine Verlagerung des Puffersystems in einen höheren Molaritätsbereich bei gleichzeitiger Absenkung des pH-Wertes auf 4,0 reduzierte das Molekulargewicht vergleichsweise nur geringfügig auf 90.000 D. Dies könnte auch auf eine partielle Abspaltung bestimmter Struktureinheiten bei diesem pH-Bereich zurückgeführt werden.

Ein Molekulargewicht von A II mit einem Elutionsmittel aus 30 %igem Ethanol, in dem die Verbindung eben noch nicht ausfiel, ließ sich nicht ermitteln. Unter diesen Bedingungen zeigten die Dextrane ein deutlich anderes Verhalten als das wahrscheinlich wesentlich komplexer aufgebaute Polysaccharid A II. Es konnte unter diesen Bedingungen noch vor dem zur Bestimmung des Ausschlußvolumens verwendeten Dextran 2.000 T eluiert werden.

Die Erklärung für diesen Sachverhalt liegt wahrscheinlich in der Tatsache begründet, daß die Gelfiltrationschromatographie Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen trennt, nicht jedoch nach ihrer Masse (GRUBISIC *et al.* 1967). Das Molekülvolumen eines Polymers hängt zwar von seinem Molekulargewicht ab, wird jedoch auch von seiner chemischen Zusammensetzung, seiner Molekülstruktur und experimentellen Parametern wie dem Lösungsmittel, der Temperatur und dem Druck bestimmt (FLORY 1953). Deshalb liefern Kalibrierungen mit Dextranen, die lineare Homopolysaccharide darstellen, bei der Molekulargewichtsbestimmung verzweigter Heteropolysaccharide nur Näherungswerte, gelangen jedoch aus Mangel an geeigneten Eichsubstanzen trotzdem auch weiterhin zum Einsatz.

Der Zusatz von 30 %igem Ethanol veränderte offenbar das hydrodynamische Volumen der Dextrane im Gegensatz zu den anderen Elutionsmitteln so drastisch, daß sie ihre Funktion als Eichsubstanzen für unsere Bedürfnisse nicht mehr erfüllen konnten.

Die bei den übrigen Laufmittelsystemen unter sehr unterschiedlichen Bedingungen aufgetretenen, nur geringen Unterschiede in den mittleren Molekulargewichten ließen das Vorliegen eines Aggregates von A II nicht wahrscheinlich erscheinen.

2.5. Partielle Charakterisierung des Polysaccharides A I

2.5.1. Allgemeine Parameter

Die Bestimmung der optischen Drehung ergab für eine 0,1 %ige Lösung von A I eine Rechtsdrehung von $[\alpha]_D^{20} = +32,1^\circ$ (DAB 9).

In der Elementaranalyse ließ sich kein Stickstoff nachweisen, so daß keine wesentlichen Aminosucker- und Proteinanteile vorliegen konnten.

Tabelle 26: Elementaranalyse des Polysaccharides A I

	C (%)	H (%)	N (%)
A I	39,1	6,4	---

2.5.2. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

Nach Totalhydrolyse mit 2 M Trifluoressigsäure ließen sich den vier im Dünnschichtchromatogramm des Polysaccharides A I erscheinenden Zonen die Vergleichssubstanzen Fucose, Xylose, Glucose und Galaktose zuordnen.

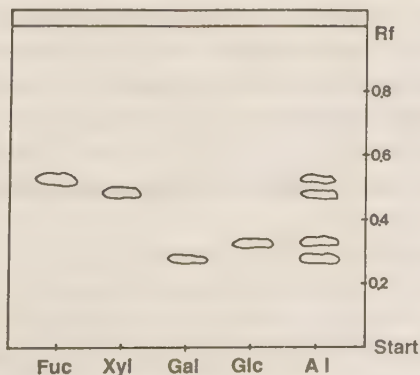


Abb. 30:

DC des Totalhydrolysates des Polysaccharides A I

Tabelle 27: Zuckeranalyse des Polysaccharides A I

 Molare Zuckerzusammensetzung:

Fucose	0,11
Arabinose	0,09
Xylose	0,52
Mannose	0,09
Galaktose	0,33
Glucose	1,0

Proteingehalt

nach LOWRY (1951):

 ---: kein Gehalt

Die molare Zusammensetzung der einzelnen Zucker ermittelten wir gaschromatographisch nach Totalhydrolyse von A I und anschließender Überführung der Monosaccharide in die Alditolacetatform. Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose und Glucose lagen demnach etwa im Verhältnis 1 : 1 : 5 : 1 : 3 : 10 vor.

Eine orientierend durchgeführte Uronsäurebestimmung lieferte einen Gehalt von 13,1 % (BITTER *et al.* 1962). Da sich größere Mengen an Glucose, wie sie in A I vorliegen, auf diese Bestimmung störend auswirken und höhere Uronsäurewerte vortäuschen können (KAKAC *et al.* 1974), ermittelten wir den Glucoseblindwert. Er entsprach genau dem "Uronsäuregehalt" von A I. Da auch im Dünnschichtchromatogramm des Totalhydrolysates jeglicher Hinweis auf eine Uronsäurezone fehlte, betrachteten wir A I als uronsäurefrei.

Nach der Elementaranalyse bestätigte eine Bestimmung nach LOWRY die Proteinfreiheit von A I.

2.5.3. Methylierungsanalyse von Polysaccharid A I

Im Anschluß an eine Acetylierung, die der Löslichkeitsverbesserung in DMSO dienen sollte, methylierten wir das Polysaccharid nach HAKOMORI (1964). Gestützt auf Vergleiche der relativen Retentionszeiten und der Massenspektren mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976), trafen wir die in Tabelle 27 wiedergegebene Zuordnung.

Das Chromatogramm wies neun Hauptverbindungen auf. Die erste (Peak 1) identifizierten wir als 1,4-Di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-arabinitol. Arabinose erschien ausschließlich in dieser Form als terminale Furanose.

Die Verbindungen von Peak 2 und Peak 5 stellten partiell methylierte Alditolacetate der Xylose dar. Dabei ließ das Derivat von Peak 2, ein 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-xylitol, diesen Zucker in endständiger Pyranoseform erkennen, während die charakteristischen Bruchstücke der Verbindung von Peak 5 einem 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methyl-xylitol entstammten und hiermit eine (1→2)-Verknüpfung andeuteten.

Das Derivat von Peak 3 identifizierten wir aufgrund der Bruchstücke *m/e* 115, 131, 161 und 175 als 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-fucitol. Daraus ergibt sich das Vorliegen einer terminalen, pyranosidischen Fucose.

Die Fragmentierungsmuster der Verbindungen von Peak 4 und Peak 7 deuteten auf ein 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol bzw. ein 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-galaktitol hin. Galaktose trat demnach in zwei Bindungsarten, als terminaler Zucker sowie kettenständig (1→2)-verknüpft, auf.

Die Interpretation der Fragmentierungen der in den Peaks 8 und 9 erschienenen Derivate, die von 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-glucitol bzw. 1,4,5,6-Tetra-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-glucitol stammen mußten, ergab für diesen Zucker das Vorliegen in kettenständig (1→4)-verknüpfter sowie (1,4,6)-verzweigter Form.

Das partiell methylierte Alditolacetat von Peak 6 zeigte ein mit der Verbindung von Peak 8 identisches Zerfallsmuster. Das entsprechende Derivat leitete sich also ebenfalls von einer (1→4)-gebundenen Hexose in Pyranoseform ab. Da jedoch nur noch Galaktose und Mannose als weitere Hexosen bei der Neutralzuckerbestimmung

Tabelle 28: Methylierungsanalyse des Polysaccharides A I

Peak	molare Zusammensetzung*	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	0,29	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	2,52	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-xylitol	101, 117, 161
3	0,43	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-fucitol	89, 101, 115, 117, 131, 161, 175
4	0,55	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
5	1,09	1,2,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,4-di- <i>O</i> -methyl-xylitol	87, 101, 117, 129, 145, 161, 189
6	1,09	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-mannitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233
7	1,19	1,2,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 129, 145, 161, 189, 205
8	1,0	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-glucitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233
9	2,1	1,4,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-glucitol	85, 87, 99, 101, 117, 127, 159, 161, 187, 201, 261

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

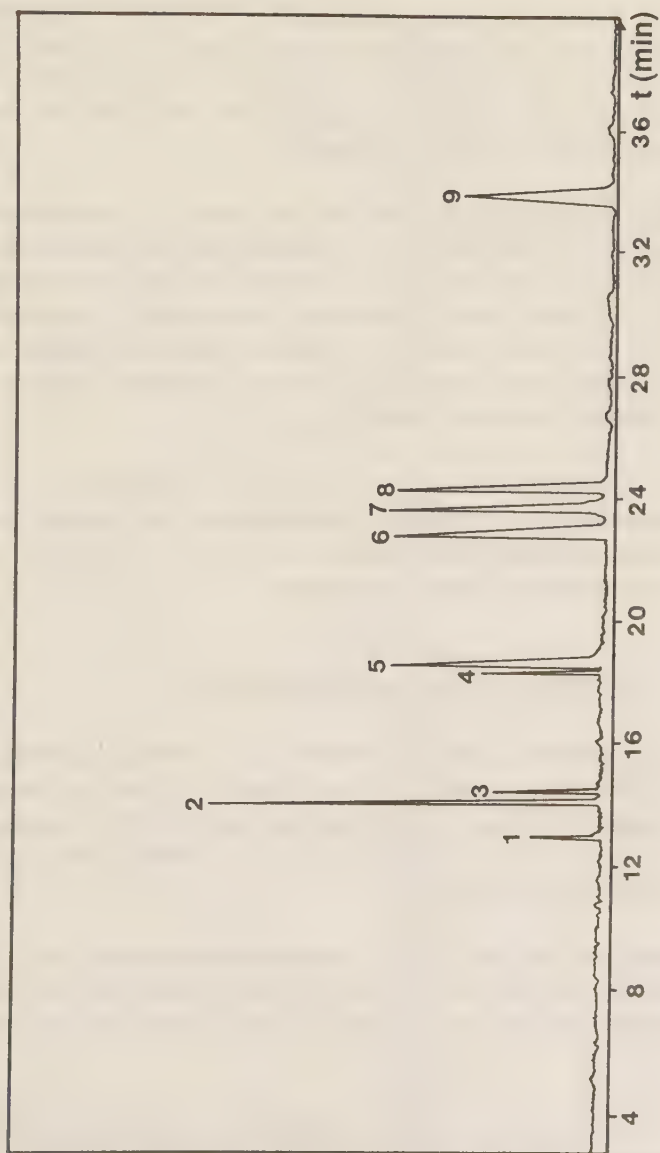


Abb. 31: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides A I

nachgewiesen wurden, (1→4)-verknüpfte Galaktose unter unseren Bedingungen aber ein Alditolacetat mit einer Retentionszeit zwischen Peak 7 und Peak 8 liefert, mußte es sich bei der Verbindung von Peak 6 um 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-mannitol handeln. Seine Retentionszeit deckte sich exakt mit dem von JANSSON und Mitarbeitern (1976) angegebenen Wert.

Die molare Zusammensetzung ergab, daß etwa zwei Drittel der vorliegenden Glucosen Verzweigungsstellen bilden mußten. In annähernd gleichen Anteilen lagen die kettenständigen Zucker Glucose, Mannose, Galaktose und Xylose vor, wobei jedoch etwa 70 % der gesamten Xylose in endständiger Form auftrat. In dieser Bindungsart stellte Xylose etwa zwei Drittel aller terminalen Reste und dominierte damit eindeutig gegenüber den ebenfalls nur am reduzierenden Ende verknüpften Formen der Zucker Galaktose, Fucose und Arabinose.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte das vorliegende Polysaccharid A I aus einer relativ hochverzweigten (1→4)-Glucanhauptkette aufgebaut sein und relativ heterogen zusammengesetzte Seitenketten mit größeren Anteilen an Xylose besitzen. A I ließ sich somit in die Gruppe der **Xyloglucane** einordnen.

2.5.4. ¹³C-NMR-Spektroskopie des Polysaccharides A I

Die ¹³C-NMR-Spektroskopie des Polysaccharides A I lieferte, entsprechend seiner komplexen Struktur, ein Spektrum mit einer Vielzahl sich teilweise überlagernder bzw. nicht aufgelöster Signale, das eine genaue Interpretation und Zuordnung aller Resonanzen nicht zuließ. Über die Konfiguration der einzelnen Zucker konnten wir ihm jedoch wichtige Hinweise entnehmen.

Die im Bereich von 174,1 ppm und 20,51 ppm auftretenden Resonanzen mußten von einer Estergruppierung stammen, da die CO- und CH₃-Signale im Spektrum einer Penta-*O*-acetyl-α-D-glucopyranose mit diesen Werten gut übereinstimmten (DORMAN *et al.* 1971).

Aufgrund der Signallage im anomeren Kohlenstoffbereich (102,62 ppm, 103,32 ppm), mußten Glucose und Galaktose β-verknüpft vorliegen. Im Gegensatz hierzu wies die Resonanz bei 99,01 ppm eindeutig auf das Vorliegen von α-gebundener Xylose hin.

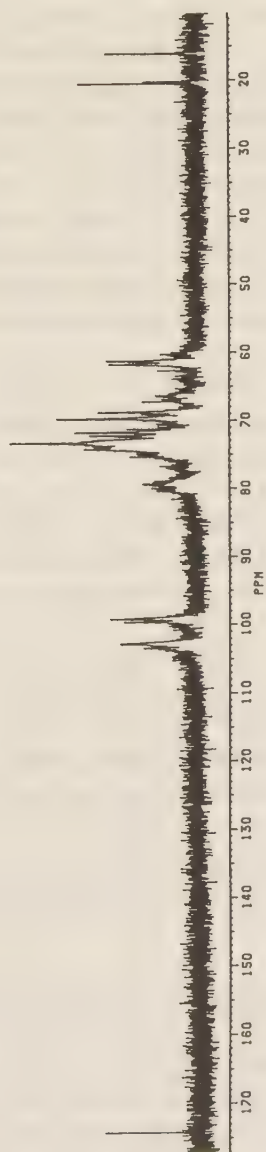


Abb. 32: ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharides A I

Tabelle 29: ^{13}C -NMR-Daten des Polysaccharides A I im Vergleich zu Cellulose (GAST *et al.* 1980), einem Glucosetrisaccharid (BASSIEUX *et al.* 1977), einem Xyloedisaccharid (PETRAKOVA *et al.* 1981), Methyl- α -D-xylopyranose (McEWAN *et al.* 1982), endständiger, nicht reduzierender Fucose (SHASHKOV *et al.* 1979) und einem Galaktosetrisaccharid (EBY *et al.* 1981)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
R→4)- β -Glc(1→R in Cellulose nach GAST	102,7	73,2	74,9	80,1	75,1	60,6
R→6)- β -Glc(1→R im Glucosetrisaccharid nach BASSIEUX	102,8	73,0	75,6	69,6	74,9	68,5
R→4)- β -Glc(1→R in A I	102,62	73,13	74,76	79,9	75,23	60,4
(1,4,6)- β -Glc in A I	102,62	73,13	74,76	79,9	75,23	69,0
α -Xyl(1→R im Xyloedi- saccharid nach PETRAKOVA	99,0	72,7	74,2	70,7	62,7	---
α -D-Xyl(1→Me nach McEWAN	100,09	71,88	73,37	69,90	61,61	---
α -Xyl(1→R in A I	99,01	71,63	73,1	69,6	61,66	---
α -L-Fuc(1→2)- β -D-Gal(1→R A B nach SHASHKOV	A: 100,1 B: 101,0	69,8 77,0	70,35 72,35	73,1 68,9	67,85 76,0	16,0 61,8
R→2)- β -D-Gal(1→R im Galaktosetrisaccharid nach EBY	103,3	81,0	73,4	69,5	75,9	61,7
Terminale Fucose in A I	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.	16,0
R→2)- β -D-Gal(1→R in A I	103,32	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.

n. z.: nicht eindeutig zuzuordnen

Eine völlige Zuordnung der sich teilweise überlagernden Signale der (1→4)- β -gebundenen Glucose und deren (1,4,6)- β -verknüpften Form im nicht anomeren Bereich zwischen 60 ppm und 80 ppm war nicht möglich. Durch Vergleiche mit ^{13}C -NMR-Daten von Cellulose und einem Glucosetrisaccharid (GAST *et al.* 1980, BASSIEUX *et al.* 1977) sollte dem C-4 Atom der (1→4)-kettenständigen Glucose ein Signal bei 79,9 ppm und die Resonanz bei 60,4 ppm dem C-6 Kohlenstoffatom desselben Zuckers zuzuordnen sein. Das Signal bei 69,0 ppm mußte vom Kohlenstoffatom in Position C-6 der (1,4,6)-verzweigten Glucose stammen, während sich die Resonanz seines C-4 Atoms bei 79,9 ppm mit demjenigen der unverzweigten Glucose deckte. Den Kohlenstoffen C-2, C-3 und C-5 beider Glucoseformen schrieben wir die Signale bei 73,13 ppm, 74,76 ppm und 75,23 ppm zu.

Deutlich schärfere Signale mit höheren Intensitäten wies die Xylose auf. Literaturvergleiche mit dem nicht reduzierenden, α -verknüpften Ende eines Xyloedisaccharides (PETRAKOVA *et al.* 1981) und mit Methyl- α -D-Xylopyranose (McEWAN *et al.* 1982) ermöglichten die Zuordnung. Den C-2, C-3, C-4 und C-5 Atomen einer terminalen α -D-Xylose im Polysaccharid A I schrieben wir daher die Resonanzen bei 71,63 ppm, 73,1 ppm, 69,6 ppm und 61,66 ppm zu.

Probleme bereitete die Zuordnung der Fucose- und Galaktosesignale. Trotz der zum Vergleich herangezogenen Daten für terminale Fucose (SHASHKOV *et al.* 1979) und ein Galaktosetrisaccharid (EBY *et al.* 1981) ließ sich in unserem Spektrum nicht jedes Kohlenstoffatom der entsprechenden Zucker zweifelsfrei identifizieren. Eine eindeutige Zuordnung gelang bei Galaktose nur für das Kohlenstoffatom C-1 mit der bereits genannten Resonanz bei 103,32 ppm, während das sehr charakteristische Signal bei 16,0 ppm dem C-6 Atom der Fucose zugeschrieben werden konnte. Auf eine genauere Interpretation der restlichen Kohlenstoffsignale dieser Zucker mußten wir deshalb verzichten.

2.5.5. Ergebnisse der partiellen Charakterisierung des Polysaccharides A I

Das aus dem Nährmedium isolierte neutrale **Polysaccharid A I** besitzt ein Molekulargewicht von 22.500 D. Es enthält eine (1→4)- β -verknüpfte Glucanhauptkette, wobei zwei Drittel aller Glucosereste Verzweigungsstellen in Position C-6 bilden. Die relativ heterogen zusammengesetzten Seitenketten bestehen aus (1→2)- β -verknüpften Galaktoseeinheiten, (1→2)- α -gebundenen Xyloseresten sowie entständigen Fucose-,

Galaktose-, Xylose- und Arabinosemolekülen. Außerdem identifizierten wir (1→4)-gebundene Mannose. Das teilweise mit Essigsäure verestert vorliegende A I weist somit alle Merkmale der in der Gruppe der Fucogalaktoxyloglucane zusammengefaßten Polysaccharide auf.

2.6. Strukturaufklärung des Polysaccharides A II

2.6.1. Allgemeine Parameter

Die Bestimmung der optischen Drehung für das Polysaccharid A II ließ eine schwache Linksdrehung von $[\alpha]_D^{20} = - 7^\circ$ erkennen (DAB 9).

Die Elementaranalyse ergab für A II einen Stickstoffgehalt von 0,98 %, so daß mit einem größeren Protein- oder Aminosuckeranteil gerechnet werden mußte.

Tabelle 30: Elementaranalyse des Polysaccharides A II

	C (%)	H (%)	N (%)
A II	38,86	6,56	0,98

2.6.2. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

Nach Totalhydrolyse mit 2 M Trifluoressigsäure trennten wir das Hydrolysat an Amberlite AG Anionenaustauschermaterial in eine saure und eine neutrale Fraktion auf und untersuchten beide mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Die neutrale Fraktion setzte sich aus Rhamnose, Arabinose und Galaktose zusammen, während der saure Teil neben Galakturonsäure noch einige andere, sehr schwache Zonen aufwies, die nicht identifiziert werden konnten und möglicherweise Abbauprodukte darstellten.

Die nach Überführung in die Alditolacetate gaschromatographisch ermittelten Werte für die molare Zusammensetzung ergaben ein Verhältnis von Arabinose zu Galaktose wie 3 : 4 und stimmen bestens mit denjenigen des Zuckeranalysators überein. Im Zuckeranalysator ließ sich jedoch, im Gegensatz zur gaschromatographischen Analyse, keine Rhamnose feststellen.

Entsprechend der Elementaranalyse lag der Proteingehalt mit 6,3 % relativ hoch (LOWRY 1951).

Der Galakturonsäuregehalt konnte mit 17,9 % bestimmt werden (BITTER *et al.* 1962).

Tabelle 31: Zuckermanalyse des Polysaccharides A II

Molare Zuckerzusammensetzung:	Alditolacetate/GC	Zuckeranalysator
Rhamnose	0,01	---
Arabinose	0,75	0,73
Galaktose	1,0	1,0
Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962)	17,9 %	n. b.
Proteingehalt nach LOWRY (1951):	6,3 %	n. b.

n. b.: nicht bestimmt

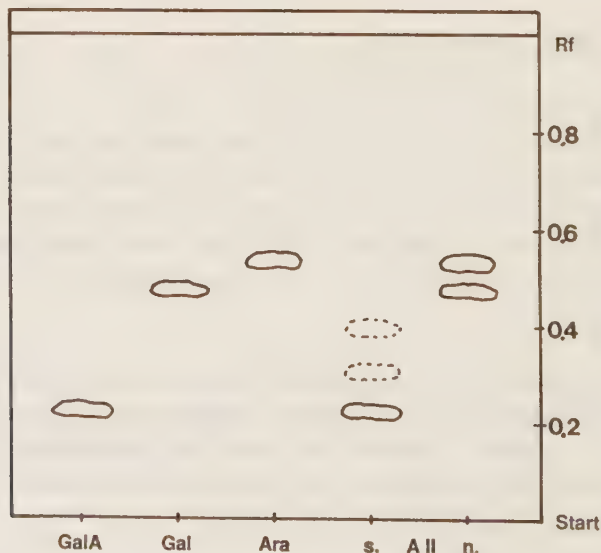


Abb. 33:

DC des Totalhydrolysates des Polysaccharides A II

2.6.3. Aminosäurebestimmung

Zur genaueren Untersuchung des Proteinanteiles führten wir eine Aminosäurebestimmung durch. Neben der normalen 15 stündigen Hydrolyse mit 6 N Salzsäure wurden die Werte für Isoleucin, Leucin und Valin mit Hilfe einer 200 Stundenanalyse ermittelt, während der Gehalt für Methionin und Cystein erst nach deren Oxidation zum Sulfon bzw. zur Säure bestimmt wurde.

Der mengenmäßig größte Anteil entfiel auf die Aminosäuren Alanin, Serin und Asparaginsäure, während Methionin und Tryptophan nicht nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich fanden sich auch 1,8 %* Glucosamin. Die genaue Zusammensetzung der Aminosäuren gibt die Tabelle 32 wieder.

Tabelle 32: Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteiles von A II

	%*		%*
Asparaginsäure	5,8	Methionin	---
Threonin	5,1	Isoleucin	1,5
Serin	6,0	Leucin	3,2
Glutaminsäure	3,7	Tyrosin	0,8
Prolin	3,0	Phenylalanin	1,3
Glycin	5,2	Histidin	1,9
Alanin	8,9	Tryptophan	---
Cystein	2,0	Lysin	1,3
Valin	2,9	Arginin	1,6

* bezogen auf den Proteinanteil

2.6.4. Pektinaseabbau

Einen Hinweis auf die Bindungsart der Galakturonsäure kann der Abbau mit Pektinase geben, da dieses Enzym (1→4)- α -verknüpfte Galakturonsäurereste spaltet. Nach entsprechender Inkubation untersuchten wir die Depolymerisationsprodukte dünnenschichtchromatographisch. In Höhe des Galakturonsäurevergleiches zeigte sich eine deutliche Zone, so daß mit dem Vorliegen der Uronsäure in dieser Bindungsart gerechnet werden durfte.

2.6.5. Methylierungsanalyse

Zur Bestimmung der Zuckerverknüpfungen acetylierten wir A II zur Verbesserung der Löslichkeit und methylierten das Polysaccharid anschließend nach der Methode von HAKOMORI (1964).

Das Chromatogramm ließ neun Peaks erkennen. Die einzelnen Verbindungen ordneten wir durch Vergleich der relativen Retentionszeiten und der Fragmentierungsmuster mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976), wie in Tabelle 33 angegeben, zu.

Arabinose lag demnach als terminaler, nicht reduzierender Zucker sowohl in Furanose- als auch in Pyranoseform vor. Dies ergab die Interpretation der Fragmentierungsmuster der Verbindungen von Peak 1 und Peak 2, die nur von 1,4-Di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-arabinitol bzw. 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-arabinitol stammen konnten.

Die partiell methylierten Alditolacetate der Peaks 3, 4 und 6 zeigten jedoch, daß diese Pentose noch in anderen Bindungsarten vorliegen mußte. Das Zerfallsschema des Derivates von Peak 3 sprach für ein 1,3,4-Tri-*O*-acetyl-2,5-di-*O*-methyl-arabinitol und damit für eine (1→3)-Verknüpfung, während das partiell methylierte Alditolacetat von Peak 4 die charakteristischen Bruchstücke eines 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-arabinitols lieferte und deshalb aus einer (1→5)-Bindung entstanden sein mußte. Die Verbindung von Peak 6 lag bei der quantitativen Erfassung unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze des Detektors. Ihre Fragmente ließen auf ein 1,3,4,5-Tetra-*O*-acetyl-2-*O*-methyl-arabinitol und somit auf eine (1,3,5)-Bindung schließen.

Das Derivat von Peak 5 identifizierten wir anhand der charakteristischen Fragmente *m/e* 117, 129, 145, 161 und 205 als 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol, so daß eine terminale Galaktose wahrscheinlich war.

Daneben lag Galaktose jedoch auch kettenständig (1→3)- und (1→6)-gebunden vor. Die entsprechenden Fragmentierungen der Verbindungen von Peak 7 und Peak 8 sprachen für 1,3,5-Tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-galaktitol bzw. ein 1,5,6-Tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-galaktitol.

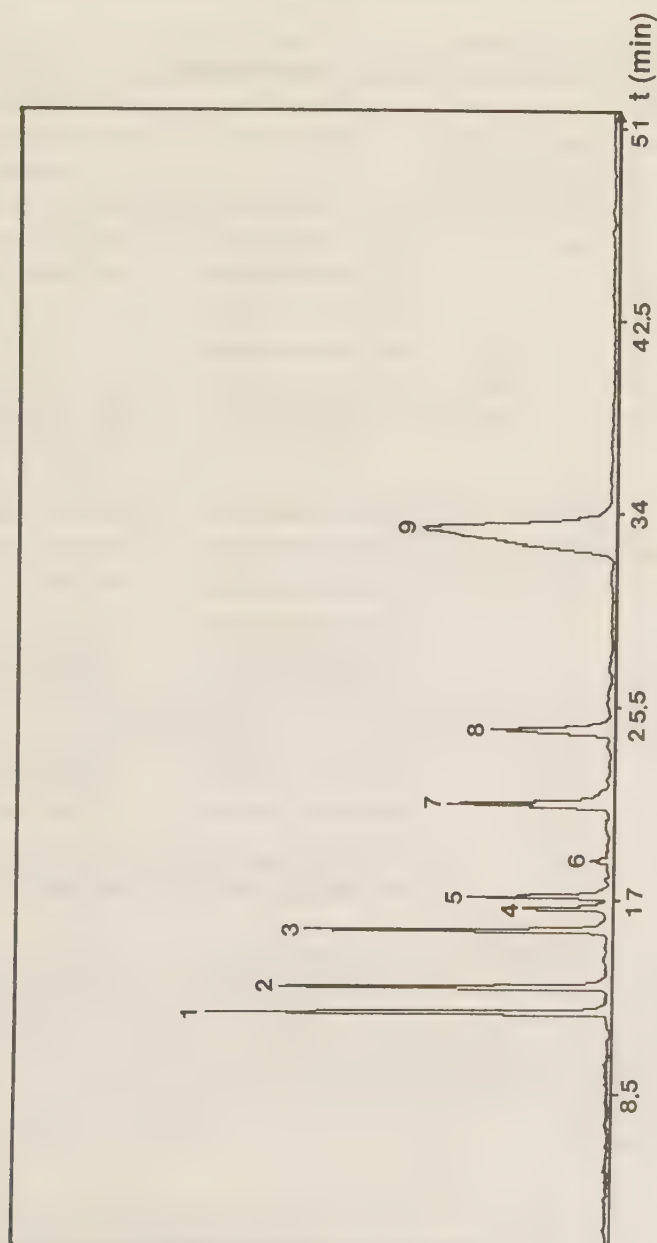


Abb. 34: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides A II

Tabelle 33: Methylierungsanalyse des Polysaccharides A II

Peak	molare Zusammensetzung* A II	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	2,5	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	2,0	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 161
3	1,7	1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 201, 233
4	0,3	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161, 189
5	0,7	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
6	n. i.	1,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -methyl-arabinitol	85, 99, 117, 127, 159, 187, 201, 217, 261
7	1,0	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 201, 233, 277
8	1,0	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
9	3,6	1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,4-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 189, 201, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

n. i.: nicht integriert

Das Derivat des Peaks 9 mit der größten Intensität lieferte ein Zerfallsmuster, dem ein 1,3,5,6-Tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-galaktitol und deshalb eine (1,3,6)-Verknüpfung zugrundeliegen mußte.

Partiell methylierte Alditolacetate der Rhamnose fanden wir nicht, obwohl wir diesen Desoxyzucker in der Neutralzuckerbestimmung, wenn auch nur in sehr geringer Konzentration, nachweisen konnten. Ebenso fehlten die ohne vorangehende Reduktion nicht auftretenden Derivate der Galakturonsäure.

Knapp 60 % der insgesamt vorhandenen Galaktose mußte demnach in (1,3,6)-verknüpfter Form vorliegen. In erheblich geringeren, mengenmäßig gleichen Anteilen von jeweils 15 % trat sie auch (1→3)- bzw. (1→6)-gebunden auf, während nur ein relativ kleiner Rest als terminaler Zucker anwesend war.

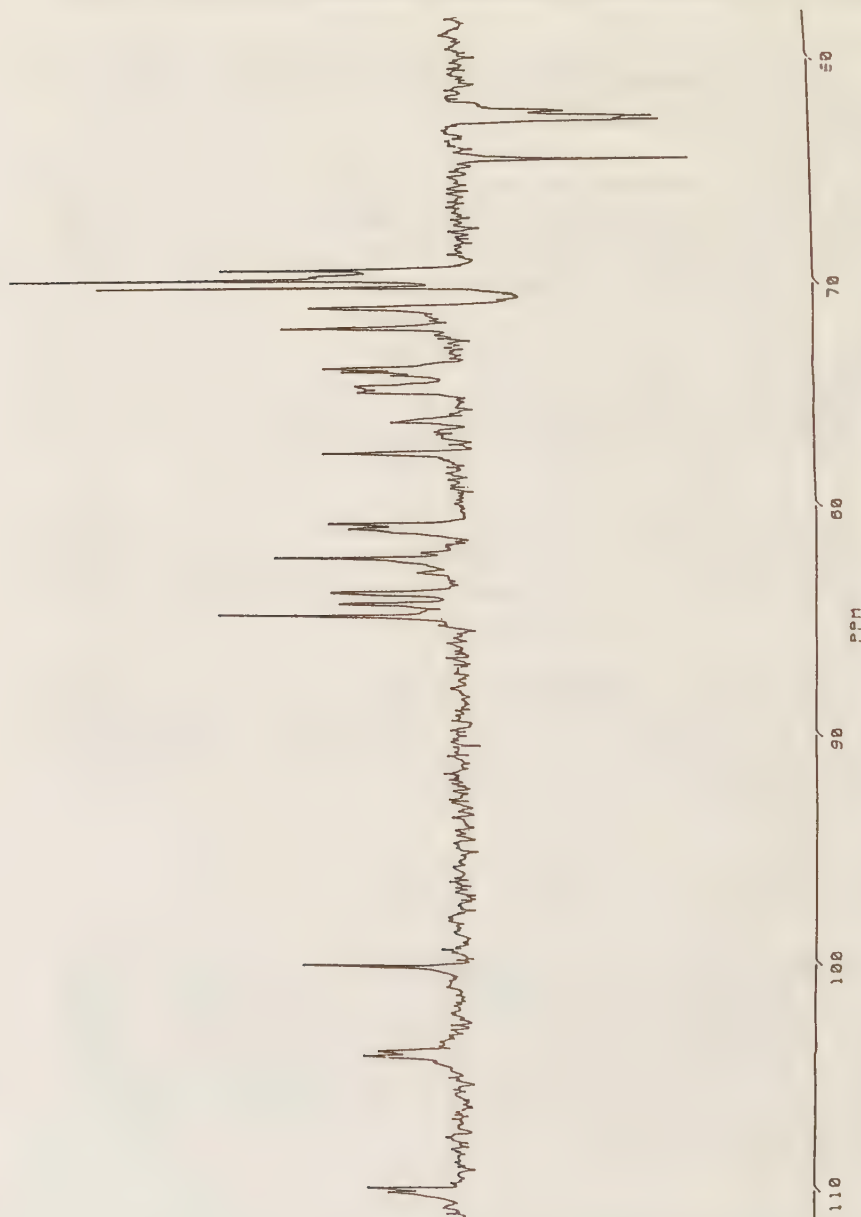
Überwiegend in endständiger Form fanden wir dagegen die Arabinose vor. Dieser Bindungsart gegenüber traten ihre kettenständigen (1→3)- und (1→5)-gebundenen Anteile, die zusammen nur ca. ein Drittel aller Arabinosen repräsentierten, deutlich zurück.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte es sich bei der vorliegenden Verbindung A II um ein **Arabinogalaktan** mit einer stark verzweigten Galaktanhauptkette handeln. Aussagen über den Aufbau der Seitenketten ließen sich aus dieser Analyse allein noch nicht treffen.

2.6.6. ¹³C-NMR-Spektroskopie des Polysaccharides A II

Zur eindeutigen Festlegung derjenigen Resonanzen, die von den in Position C-5 der Pentosen bzw. C-6 der Hexosen auftretenden CH₂-Gruppen hervorgerufen werden, führten wir zusätzlich ein APT-Experiment* durch. CH₂-Signale erhalten in diesem Spektrum eine negative Intensität und lassen sich so leicht von den übrigen Resonanzen unterscheiden. Solche Signale traten nur im Bereich von 62 ppm, bei 64,30 ppm und bei 70,47 ppm auf.

* APT-Experiment: Attached-Proton-Test-Experiment: Bestimmte Impulsfolge zur Festlegung der CH₂-Signale im ¹³C-NMR-Spektrum.

Abb. 35: APT- ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharides A II

Im anomeren Bereich erschienenen fünf, deutlich voneinander getrennte Signale bei 110,43 ppm, 110,27 ppm, 100,38 ppm, 104,44 ppm und 104,16 ppm. Aufgrund der Tatsache, daß im Polysaccharid A II neben den beiden Neutralzuckern Arabinose und Galaktose nur noch Galakturonsäure in größeren Mengen enthalten ist, diese jedoch normalerweise im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht erscheint (BREITMAIER *et al.* 1977), ordneten wir die Signale bei 104,44 ppm und 104,16 ppm β -gebundener Galaktopyranose zu. Die beiden zu tieferem Feld verschobenen Resonanzen bei ca. 110 ppm sollten dann von α -verknüpfter Arabinofuranose stammen, während derselbe Zucker in β -Konfiguration und Pyranoseform das Signal bei 100,38 ppm ergab. Das Vorliegen endständiger Arabinopyranosen in A II hatte die Methylierungsanalyse bereits angedeutet.

Die Interpretation der Signale im nicht anomeren Bereich des Galaktanteiles von A II führten wir mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Literaturdaten von Oligosacchariden (COLLINS *et al.* 1981b, SRIVASTAVA *et al.* 1980) und einem Arabinogalaktan aus der Rinde von *Melia azadirachta* (KUOKAWA *et al.* 1988) durch, die (1 $\rightarrow$ 3)-, (1 $\rightarrow$ 6)- und (1,3,6)-verknüpfte Galaktosereste enthalten.

Neben dem anomeren Atom C-1 bei 104,44 ppm ließen sich die Signale bei 71,77 ppm, 82,36 ppm, 69,47 ppm, 76,16 ppm und 62,07 ppm den Kohlenstoffatomen C-2, C-3, C-4, C-5 und C-6 der (1 $\rightarrow$ 3)- β -gebundenen Galaktose zuordnen. Sie stimmten sehr gut mit den Resonanzen des Galaktosylrestes B eines Tetrasaccharides nach COLLINS überein. In gleicher Weise deckten sich die Daten eines (1 $\rightarrow$ 6)- β -verknüpften Galaktosylrestes A nach SRIVASTAVA mit den Signalen, die wir für eine entsprechend gebundene Galaktose im Spektrum von A II fanden. Die Resonanzen für C-2, C-3, C-4, C-5 und C-6 lagen demnach bei 71,77 ppm, 73,63 ppm, 69,47 ppm, 74,43 ppm und 70,47 ppm, wobei einige Signale mit denjenigen der (1 $\rightarrow$ 3)-gebundenen Galaktose überlappten. Für die Zuordnung der (1,3,6)-verknüpften Galaktose verglichen wir die Signale im Spektrum von A II mit denjenigen eines *Melia azadirachta* Arabinogalaktans nach KUOKAWA. Dort wurden für die (1,3,6)-verzweigte Galaktose nur die Signale der Positionen C-1, C-3 und C-6 zugeordnet. Den C-2, C-3, C-4 und C-6 Kohlenstoffatomen der (1,3,6)-gebundenen Galaktose in A II schrieben wir die Signale bei 71,77 ppm, 82,36 ppm 69,47 ppm und 70,47 ppm zu. Die Resonanz des Atoms C-5 ließ sich nicht genau identifizieren.

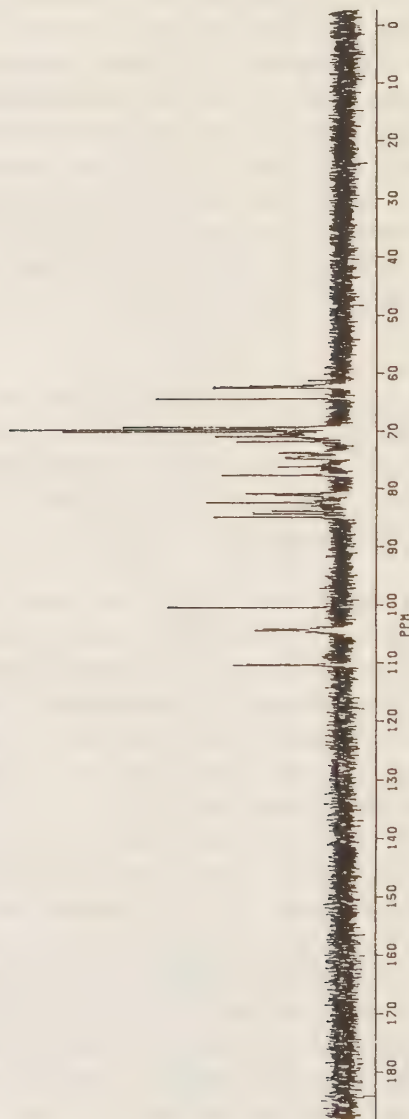


Abb. 36: ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharides A II

Tabelle 34: ^{13}C -NMR-Daten des Galaktanteiles im Polysaccharid A II im Vergleich zu Oligosacchariden (COLLINS *et al.* 1981b, SRIVASTAVA *et al.* 1980) und (1,3,6)-verknüpfter Galaktose im Arabinogalaktan aus *Melia azadirachta* (KUROKAWA *et al.* 1988)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal-R}$ nach COLLINS	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal-R}$ in A II	104,44	71,77	82,36	69,47	76,16	62,07
R- $\beta\text{-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow\text{CH}_3)$ nach SRIVASTAVA	104,3	71,2	73,1	69,3	74,2	69,1
R $\rightarrow 6\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow\text{R in A II})$	104,44	71,77	73,63	69,47	74,43	70,47
(1,3,6)-verknüpfte- $\beta\text{-D-Galaktose}$ nach KUROKAWA	105,1	n. z.	83,0	n. z.	n. z.	70,7
(1,3,6)-verknüpfte- $\beta\text{-Galaktose}$ in A II	104,16	71,77	82,36	69,47	n. z.	70,47

n. z.: nicht eindeutig zuzuordnen

Für die Interpretation der Signale der Arabinose griffen wir auf entsprechende Daten für ein Methyl- $\alpha\text{-L-arabinofuranosid}$ (BREITMAIER *et al.* 1973), ein Methyl- $\beta\text{-L-arabinopyranosid}$ (GORIN *et al.* 1975) und eine endständige $\alpha\text{-Arabinofuranose}$ in einem Arabinogalaktan aus dem Weinbeerenmark zurück (SAULNIER *et al.* 1988).

Deutlich treten im Spektrum von A II neben dem Signal bei 100,38 ppm Resonanzen mit hoher Intensität bei 64,3 ppm, 69,2 ppm, 69,64 ppm und 70,0 ppm hervor. Diese Signale ordneten wir den Kohlenstoffatomen C-5, C-2, C-3 und C-4 des nicht anomeren Bereiches einer endständigen, β -gebundenen Arabinopyranose zu. Insbesondere das sehr scharfe Signal des anomeren Kohlenstoffatoms sprach für die β -Verknüpfung der Arabinose an stets dergleichen Position.

Tabelle 35: ^{13}C -NMR-Daten des Arabinanteiles im Polysaccharide A II im Vergleich zu Methyl- β -L-arabinopyranosid (GORIN *et al.* 1975), Methyl- α -L-arabinofuranosid (BREITMAIER *et al.* 1973) und terminaler, α -verknüpfter Arabinofuranose im Arabinogalaktan aus Weinbeerenmark (SAULNIER *et al.* 1988)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
β-L-Arap(1$\rightarrow$CH₃ nach GORIN	101,0	69,4	69,9	70,0	63,8
β-Arap(1$\rightarrow$R in A II	100,38	69,20	69,64	70,00	64,30
α -L-Araf(1 $\rightarrow$ CH ₃ nach BREITMAIER	109,5	82,0	77,9	84,9	62,5
α -L-Araf(1 $\rightarrow$ R nach SAULNIER	109,9	82,3	77,8	84,9	62,3
α-Araf(1$\rightarrow$R in A II	110,27	82,36	77,60	84,86	62,29

Untersuchungen mit reinen Arabinanen aus *Rosa glauca* (JOSELEAU *et al.* 1975) und *Althea officinalis* (CAPEK *et al.* 1983) sowie einem Arabinogalaktan aus *Viscum album* Beeren (JORDAN *et al.* 1986) zeigten, daß für das Anomerensignal einer terminalen α -gebundenen Arabinofuranose in Arabinanen eine Verschiebung der Resonanz von über 1 ppm zu höherem Feld im Vergleich zu einer Bindung desselben Zuckers an Galaktanstrukturen beobachtet werden kann. Eine ähnliches Verhalten erscheint für eine terminale, β -verknüpfte Arabinopyranose denkbar. Da nur ein Signal in diesem Bereich erschien, liegt diese endständige Pentose im Polysaccharid A II wahrscheinlich immer nur an denselben Zucker gebunden vor. Ob es sich hierbei um Arabinose oder Galaktose handelt, ließ sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht klären.

Das anomere Kohlenstoffatom der α -verknüpften Arabinofuranose lag bei 110,27 ppm, während die Resonanzen ihrer C-2, C-3, C-4 und C-5 Atome bei 82,36 ppm, 77,6 ppm, 84,86 ppm und 62,29 ppm auftraten. Sie decken sich praktisch mit denjenigen eines entsprechenden Zuckers aus dem Weinbeerenmark-Arabinogalaktan.

Signale für (1→3)-, (1→5)-, (1,3,5)-gebundene Arabinoseeinheiten und terminale Galaktosereste ließen sich aufgrund ihres geringen Gehaltes in A II im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht nachweisen.

2.6.7. Partialhydrolyse des Polysaccharides A II

Um noch weitere Informationen über den Polysaccharidgrundkörper zu erhalten, führten wir eine partielle Depolymerisation von A II mit 0,05 M Trifluoressigsäure durch und nutzten dabei die unterschiedliche Stabilität der einzelnen glykosidischen Bindungen aus.

Anschließend untersuchten wir das Gemisch dünnenschichtchromatographisch. In Höhe des Arabinosevergleiches zeigte sich eine kräftige Bande; ebenso ließen sich mehrere Zonen im Bereich der Oligosaccharide erkennen, während Galaktose nur in Spuren erschien.

Zur Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile dialysierten wir das Hydrolyseprodukt A IIP erschöpfend gegen demineralisiertes Wasser. Die nach Totalhydrolyse ermittelte molare Zuckerzusammensetzung von A IIP ergab nur noch geringe Anteile an Arabinose. Die Daten der Uronsäure- bzw. Proteinbestimmung erhöhten sich jedoch entsprechend der in Relation zum genuine A II jetzt reduzierten Größe des Gesamtmoleküles.

Tabelle 36: Zuckeranalyse des Partialhydrolysates A IIP

Molare Zuckerzusammensetzung:

Rhamnose	0,03
Arabinose	0,07
Xylose	Spuren
Galaktose	1,0
Glucose	Spuren

Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962)	24,0 %
---	--------

Proteingehalt nach LOWRY (1951):	10,8 %
-------------------------------------	--------

2.6.8. Methylierungsanalyse von A IIP

Die Methylierungsanalyse des partiellen Hydrolyseproduktes A IIP wurde wiederum nach HAKOMORI (1964) durchgeführt. Die Interpretation erfolgte durch Vergleiche der relativen Retentionszeiten und der erhaltenen GC-MS-Spektren mit Literaturdaten (JANSSON *et al.* 1976). Demnach unterschieden sich A II und A IIP in folgenden Punkten:

Arabinose erschien in A IIP nur noch als terminaler Zucker, allerdings sowohl in Furanose- als auch in Pyranoseform. Dies ließen die Fragmente von Peak 1 und 2 erkennen, die von einem 1,4-Di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-arabinitol bzw. 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-arabinitol stammten.

Qualitative Veränderungen in den Bindungsverhältnissen der Galaktose ließen sich im Partialhydrolysat von A II nicht feststellen. Dieser Zucker lag weiterhin endständig, kettenständig (1→3)- und (1→6)-gebunden sowie (1,3,6)-verknüpft vor. Dies ergab die Interpretation der Fragmentierungsmuster der Peaks 3, 4, 5 und 7, denen nur die partiell methylierten Alditolacetate 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol, 1,3,5-Tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-galaktitol, 1,5,6-Tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-galaktitol und 1,3,5,6-Tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-galaktitol zugrundeliegen konnten.

Erheblich Unterschiede zeigten sich jedoch in quantitativer Hinsicht. Dem im Vergleich zum genuinen A II drastisch reduzierten Anteil der (1,3,6)-verknüpften Galaktose entsprach die jetzt in stark erhöhtem Umfang nachweisbare (1→6)-gebundene Form. Ihr Verhältnis zur kettenständigen (1→3)-verknüpften Galaktose, das im Nativpolysaccharid noch bei 1 : 1 lag, verschob sich in A IIP auf 2,2 : 1. Die Menge an terminaler Galaktose vergrößerte sich ebenfalls um mehr als das Doppelte.

Die terminale Arabinofuranose erfuhr durch die Trifluoressigsäurebehandlung eine Verminderung auf ein Viertel ihres ursprünglichen Gehaltes, während sich die Menge der endständigen Arabinopyranosen nur etwas mehr als halbierte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit anderen Untersuchungen, nach denen α -Bindungen sich schneller als β -Verknüpfungen hydrolysieren lassen und Furanosen deutlich empfindlicher gegenüber Säureeinwirkungen als Pyranosen reagieren (ASPINALL 1982b).

Tabelle 37: Methylierungsanalyse des Partialhydrolyseproduktes A IIP

Peak	molare Zusammensetzung* A IIP	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	0,67	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	0,84	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 161
3	1,73	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
4	1,0	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 201, 233, 277
5	2,2	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
7	1,17	1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,4-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 189, 201, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

Peakzuordnung siehe Abbildung 37, Seite 100

Die Arabinose sollte also vorwiegend in Position C-3 der (1,3,6)-verknüpften Galaktose gebunden vorliegen, daneben jedoch auch bei einigen (1→6)-verknüpften Galaktoseresten in C-6 Stellung zu finden sein.

2.6.9. Reduktion der Galakturonsäure

Der Abbau von A II mit Pektinase in D.3.6.4. ergab bereits einen ersten Hinweis auf das Vorliegen (1→4)- α -gebundener Galakturonsäuren. Zur Überprüfung reduzierten wir das zuvor methylierte Partialhydrolyseprodukt A IIP mit LiAlD₄ in Tetrahydrofuran (UKAI *et al.* 1977). LiAlD₄ reduziert die Carboxylgruppe zum primären Alkohol bei

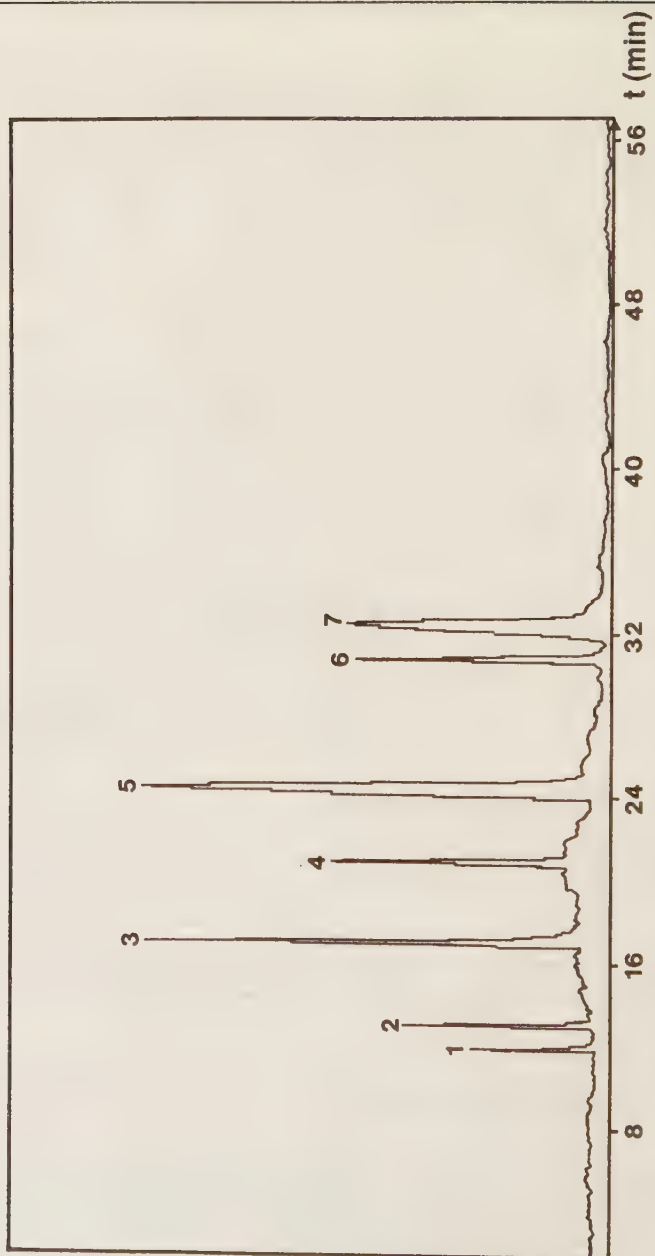


Abb. 37: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des reduzierten Partialhydrolysates A IIPR

Tabelle 38: Methylierungsanalyse des carboxylreduzierten Partialhydrolyseproduktes A IIPR

Peak	molare Zusammensetzung* A IIPR	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	0,67	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	0,84	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 161
3	1,73	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
4	1,0	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 201, 233, 277
5	2,2	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
6	1,0	1,4,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- <i>d</i> ₂	87, 101, 117, 129, 161, 203, 263
7	1,17	1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,4-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 189, 201, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

gleichzeitiger Markierung des C-6 Kohlenstoffes der ehemaligen Uronsäure durch doppelten Deuteriumeinbau. Nachfolgende Hydrolyse, Reduktion der Monosaccharide mit NaBH₄ und Acetylierung zu den entsprechenden partiell methylierten Alditolacetaten ergibt aus der ursprünglich (1→4)-gebundenen Uronsäure ein 1,4,5,6-Tetra-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-galaktitol-6,6-*d*₂, dessen charakteristische Massenbruchstücke m/e 263 und 203 seine Herkunft eindeutig belegen.

Zusätzlich zu den bei der Methylierungsanalyse des partiellen Hydrolyseproduktes A IIP bereits aufgetretenen Peaks erschien im Gaschromatogramm des nach LiAlD₄ Behandlung analog derivatisierten A IIPR mit Peak 6 eine weitere Verbindung. Sie zerfiel in die Fragmente m/e 87, 101, 117, 129, 161, 203 und 263 und konnte damit nur von dem oben bereits erwähnten Derivat einer (1→4)-gebundenen Galakturonsäure stammen.

2.6.10. ¹³C-NMR-Spektroskopie des partiellen Hydrolyseproduktes A IIP

A IIP lieferte ein im Vergleich zum genuine Polysaccharid stark vereinfachtes Spektrum. Dabei erschien im Bereich der anomeren Kohlenstoffe nur noch ein Signal bei 103,41 ppm. Nachdem die Methylierungsanalyse des partiellen Hydrolyseproduktes gezeigt hatte, daß von den vier Bindungsarten der Galaktose die (1→6)-verknüpfte Form deutlich überwog, schrieben wir dieses Signal dem C-1 Atom einer (1→6)-verknüpften Galaktose zu. Die Zuordnung der übrigen Resonanzen erfolgte wiederum durch Vergleich mit dem Galaktosylrest A nach SRIVASTAVA und Mitarbeitern (1980). Sie ergab für die Kohlenstoffatome C-2, C-3, C-4, C-5 und C-6 die sehr intensiven Signale bei 70,82 ppm, 72,74 ppm, 69,38 ppm, 73,78 ppm und 68,74 ppm. Da keine anderen Resonanzen von anomeren Kohlenstoffatomen auftraten, mußten auch diejenigen der terminalen, (1→3)-gebundenen und (1,3,6)-verknüpften Galaktosen in dem Signal bei 103,41 ppm zusammengefallen sein. Ähnliches beschrieben SAULNIER und Mitarbeiter (1988) für den Galaktanteil eines Arabinogalaktans aus Weinbeerenmark. Die genaue Interpretation der nicht anomeren Kohlenstoffe von A IIP mit den entsprechenden Modellsubstanzen findet sich in Tabelle 39, wobei eine gute Übereinstimmung der Verschiebungen festgestellt werden kann.

Das relativ verbreiterte Signal bei 81,91 ppm müßte von dem C-3 Atom einer (1→3)- oder (1,3,6)-gebundenen Galaktose stammen. Diese auch schon bei einem Arabinogalaktan aus dem Holz von *Larix sibirica* L. für ein glykosidiertes C-3 Atom beobachtete Verbreiterung wurde von KARACSONYI und Mitarbeitern (1984) auf die unterschiedliche Beweglichkeit der Galaktoseeinheiten innerhalb verschieden langer Oligo- und Polysaccharidketten zurückgeführt. Sie zogen deshalb die Schlußfolgerung, daß die Verbreiterung des C-3 Signales durch eine längere (1→3)-gebundene Galaktopyranossekette bedingt ist. Eine derartig verknüpfte Hauptkette scheint offenbar auch das Polysaccharid A II zu besitzen.

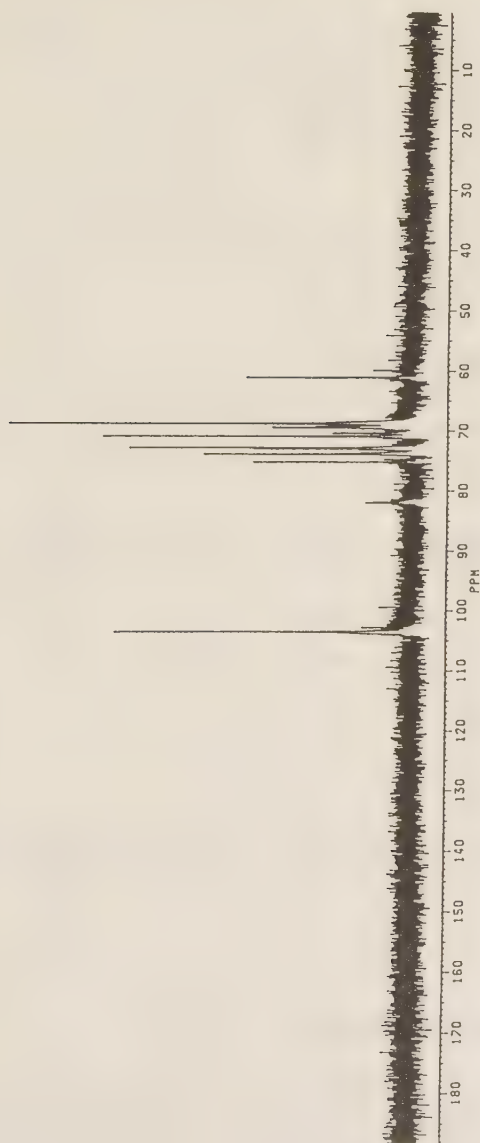


Abb. 38: ^{13}C -NMR-Spektrum des partialhydrolysierten Polysaccharides A IIP

Tabelle 39: ^{13}C -NMR-Daten des Partialhydrolyseproduktes A IIP im Vergleich zu Oligosacchariden (COLLINS *et al.* 1981b, SRIVASTAVA *et al.* 1980), Methyl- β -D-galaktopyranosid (GORIN *et al.* 1975) und (1,3,6)- β -verknüpfter Galaktose im Arabinogalaktan aus dem Weinbeerenmark (SAULNIER *et al.* 1988)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal-R nach COLLINS	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal-R in A IIP	103,41	70,82	81,91	69,38	75,15	61,07
R- β -Gal(1 $\rightarrow$ 6)- β -Gal(1 $\rightarrow$ CH ₃) nach SRIVASTAVA	104,3	71,2	73,1	69,3	74,2	69,1
R $\rightarrow$ 6)- β -Gal(1 $\rightarrow$ R in A IIP	103,41	70,82	72,74	69,38	73,78	68,74
β -D-Gal(1 $\rightarrow$ CH ₃ nach GORIN	104,9	71,8	73,9	69,8	76,2	62,1
β -Gal(1 $\rightarrow$ R in A IIP	103,41	70,82	72,90	69,38	75,15	61,07
(1,3,6)-verknüpfte- β -D- Galaktose nach SAULNIER	104,2	71,8	81,1	70,3	74,7	69,3
(1,3,6)-verknüpfte- β - Galaktose in A IIP	103,41	70,82	81,91	70,32	73,78	68,74

2.6.11. Strukturvorschlag für das Polysaccharid A II

Bei dem Polysaccharid A II sollte es sich nach den durchgeführten Analysen um ein **Proteoglykan** handeln, das nach STEPHEN (1983d) in die Gruppe der **Arabino-3,6-galaktan-Proteine** eingereiht werden kann.

2.7. Vergleich der isolierten Polysaccharide A I und A II mit Polysacchariden der Literatur

Polysaccharid A I mit einem Molekulargewicht von 22.500 D enthält eine (1→4)- β -verknüpfte Glucanhauptkette, bei der zwei Drittel aller Glucosereste Verzweigungsstellen in Position C-6 besitzen. Dort binden relativ heterogen zusammengesetzte Seitenketten aus (1→2)- β -verknüpften Galaktoseeinheiten, (1→2)- α -gebundenen Xyloseresten sowie entständigen Fucose-, Galaktose-, Xylose- und Arabinosemolekülen. Polysaccharid A I liegt teilweise mit Essigsäure verestert vor und läßt sich der Klasse der Fucogalaktoxyloglucane zuordnen.

Die Isolierung ähnlich strukturierter Polysaccharide gelang bisher aus dem Nährmedium und den Zellwänden von Sycamore-Gewebekulturen (*Acer pseudoplatanus*) (BAUER *et al.* 1973), aus *Phaseolus mungo* (KATO *et al.* 1976), aus Rübsamenschalen (ASPINALL *et al.* 1977), aus der Sojabohne (KATO *et al.* 1977), aus Jojobasamen (WATANABE *et al.* 1980), aus *Phaseolus coccineus* (O'NEILL *et al.* 1983), aus *Phaseolus vulgaris*-Zellkulturen (WILDER *et al.* 1973) und aus dem Nährmedium von *Echinacea pupurea* Zellkulturen (WAGNER *et al.* 1988b). Die an die Glucanhauptkette gebundenen Seitenketten dieser Polysaccharide bestehen entweder nur aus terminalen Xyloseresten oder setzen sich aus α -L-Fuc-(1→2)- β -D-Gal-(1→2)- α -D-Xyloseresten zusammen, denen manchmal auch die terminale Fucose fehlt. Einige dieser Polysaccharide, wie das Sycamore- oder das Rübsamen-Xyloglucan, enthalten ebenso wie unser Polysaccharid A I Arabinose. Sie liegt in diesen Fällen als endständiger Zucker vor, der mit Position C-2 der in der Seitenkette befindlichen Xylose verknüpft ist. Keines der oben erwähnten Polysaccharide weist jedoch die bei A I gefundene Mannose auf.

Das saure **Polysaccharid A II** besitzt ein Molekulargewicht von 100.000 D und weist einen Proteingehalt von 6,3 % auf. Größere Anteile an Alanin und Serin charakterisierten den Proteinrest, während der Kohlenhydratanteil aus einem sauren Arabino-3,6-galaktan besteht. Damit zeigt A II alle Strukturmerkmale eines zu den Proteoglykanen zählenden Arabino-3,6-galaktan-Proteins (AGPs), das nach ASPINALL auch unter die Arabinogalaktane vom Typ II eingeordnet werden kann, wie sie schon häufiger aus dem Nährmedium von Gewebekulturen (FINCHER *et al.* 1983) oder aus Pflanzengummen (CLARKE *et al.* 1979) gewonnen werden konnten.

Strukturell ähnliche Arabino-3,6-galaktan-Proteine ließen sich kürzlich aus dem Weinbeerenmark (SAULNIER *et al.* 1988b), aus dem Nährmedium von *Lolium multiflorum* (BACIC *et al.* 1987), aus den Samen von *Raphanus sativus* (TSUMURAYA *et al.* 1987) und aus dem Gummi von *Acacia tortilis* (GAMMON *et al.* 1986) isolieren. Das aus *Acacia* gewonnene Arabino-3,6-galaktan-Protein enthält anstelle der Galakturonsäure Glucuronsäure und ihren 4-Methylether als terminale Reste der Seitenketten. Der erstgenannte Zucker findet sich, allerdings in geringer Menge, neben Rhamnose und Mannose auch in dem als neutral eingestuftes Weinbeerenpolysaccharid. Galakturonsäure ließ sich hier ebenfalls nicht nachweisen. Das *Lolium*-Arabinogalaktan unterscheidet sich vom Arnikapolysaccharid A II durch das Auftreten einzelner (1,3,4,6)-verzweigter Galaktosereste in der Hauptkette. Ein Charakteristikum des aus dem Rettich stammenden Proteoglykans bilden seine Xyloseanteile, die in A II fehlen.

E. **UNTERSUCHUNGEN ÜBER STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN VON ECHINACEA-POLYSACCHARIDFRAKTIONEN AUS GROSSTECHNISCHER PRODUKTION**

1. Einführung

Nachdem BONADEO und Mitarbeiter (1971) Hinweise auf ein im Wasserextrakt von **Echinacea purpurea** (L.) Moench enthaltenes saures Rohpolysaccharid mit Hyaluronidasehemmung bzw. cortisonähnlicher Wirkung erhalten hatten, gelang es PROKSCH, aus einem mit 0,5 M Natronlauge hergestellten Extrakt von *Echinaceae purpureae herba* zwei Polysaccharide mit immunstimulierenden Eigenschaften zu isolieren und ihre Struktur zu klären. Es handelte sich um ein Heteroxylyan mit einem mittleren Molekulargewicht von 35.000 D und um ein 450.000 D großes Arabinorhamnogalaktan (PROKSCH *et al.* 1987, WAGNER *et al.* 1981a).

Schwierigkeiten bei der Nachisolierung größerer Substanzmengen aus Pflanzenmaterial für die weiteren biologischen Untersuchungen führten zum Einsatz von Zellkulturen. Auf diesem Wege gelang es im Labormaßstab, aus der Nährlösung ein Polysaccharidgemisch zu isolieren und hieraus durch fraktionierte Alkoholfällungen drei chemisch definierte Polysaccharide zu isolieren. Es handelte sich um zwei neutrale Fucogalaktoxyloglucane mit mittleren Molekulargewichten von 10.000 D und 25.000 D und um ein saures 115.000 D großes Arabinogalaktan (WAGNER *et al.* 1988b). Die aus der Zellkultur gewonnenen Polysaccharide wiesen zwar z. T. mit den aus der Pflanze isolierten Verbindungen gewisse Ähnlichkeiten auf, waren aber nicht mit diesen identisch.

Insbesondere das saure Arabinogalaktan konnte bei pharmakologischen Untersuchungen als weitgehend monospezifischer, nur auf Makrophagen und Granulozyten wirkender Stimulator erkannt werden. Neben einer ausgezeichneten Aktivierung von Makrophagen zur Sekretion von Interferon β_2 und Sauerstoffradikalen vermochte es auch, Makrophagen *in vitro* zur Zytotoxizität gegen Leishmania Parasiten und

Candida albicans zu stimulieren. Prophylaktisch verabreicht, zeigte sich dieses Polysaccharid auch in vivo in der Lage, eine anschließend bei Mäusen gesetzte Infektion mit *Candida albicans* 100 %ig zu antagonisieren. Es vermochte somit alle Tiere vor der sonst letal verlaufenden Infektion zu schützen.

Besonders bemerkenswert scheint jedoch seine Fähigkeit, bei Makrophagen in hohem Maße die Sekretion des Tumor-Nekrose-Faktors $\text{TNF-}\alpha$ zu induzieren (LOHMANN-MATTHES *et al.* 1989). Die vielfältigen Eigenschaften dieses Monokins konnten erst in jüngster Zeit in vollem Umfang erkannt werden. Sie finden sich in F.6. S. 172 zusammengefaßt.

Mit dem Echinacea-Arabinogalaktan ließen sich erstmals für ein Polysaccharid aus höheren Pflanzen TNF-stimulierende Eigenschaften nachweisen. Die notwendigen weiterführenden pharmakologischen Untersuchungen erforderten eine größere Substanzmenge, die nur durch biotechnologische Produktion im industriellen Maßstab bereitgestellt werden konnte. Hierzu mußten neue Herstellungs- und Aufbereitungsverfahren entwickelt werden.

2. Entwicklung neuer Aufbereitungsverfahren

2.1. Produktion und Isolierung im Labormaßstab

Die ursprüngliche Produktion der Echinacea purpurea Zellkulturen* fand in 1 l Erlenmeyerkolben mit ca. 250 ml Nährmedium statt. Aus diesem Nährmedium isolierte STUPPNER in Anlehnung an CALDES und Mitarbeiter (1981) durch wiederholte Alkoholfällungen ein Rohpolysaccharidgemisch, das durch anschließende Chromatographie an Ionenaustauscher- und Gelfiltrationssäulen die beiden Fucogalaktosylglucane und das saure Arabinogalaktan lieferte.

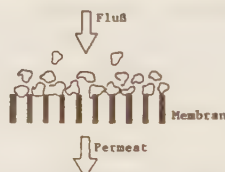
2.2. Produktion und Isolierung im großtechnischen Maßstab

Für die Gewinnung großer Volumina an Fermentationslösungen installierte die auf biotechnologische Produktion spezialisierte Fa. Diversa, Hamburg, eine Fermenteranlage mit einem Fassungsvermögen von 75.000 l. Die erforderliche Alkoholmenge für

* Die Echinacea purpurea Zellkulturen wurden von Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk, Institut für Pharmazeutische Biologie, München, angelegt.

die nötigen Fällungen bei einem so gewaltigen Volumen an Nährlösung sprengte den wirtschaftlich vertretbaren Rahmen. Zur Lösung dieses Problems wurde daher ein Verfahren entwickelt, das vor der anschließenden Fällung eine schonende Aufkonzentrierung der Wirkstoffe mit dem Ziel eines günstigeren Ausbeute/Volumenverhältnisses vorsieht. In einem ersten Schritt findet eine Trennung zwischen festem Zellmaterial und Nährlösung statt. Noch vorhandene Resttrübungen werden entfernt und die klare Nährlösung über Polysulfonmembranen der nominellen Trenngröße 10^6 D mikrofiltriert. Es folgt der Konzentrierungsschritt durch Ultrafiltration an Polysulfonmembranen der Trenngröße 10^4 D nach dem Querstromprinzip. Dieses erlaubt, in einem Kreislauf kolloidale Lösungen bis zum 100fachen der Ausgangskonzentration anzureichern, ohne daß wie bei konventionellen Filtrationen Verblockungen der Membran auftreten.

Konventionelle Filtration



Querstromfiltration

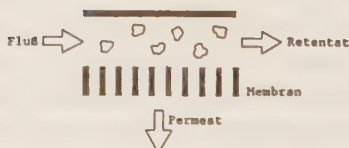


Abb. 40: Prinzip der Querstromfiltration

Eine nachfolgende Diafiltration dient der Entsalzung, an die sich ähnlich dem Laborverfahren Alkoholfällung, Schlauchdialyse und Gefriertrocknung anschließen. Bei der Anionenaustauschchromatographie findet eine ZetaPrep-Kartusche der Fa. AMF, Meriden, USA, Verwendung, mit deren Hilfe nach Elution mit Wasser sowie mit einem Salzgradienten die neutralen bzw. sauren Fraktionen erhalten werden. Sie stellen nach erneuter Diafiltration die Polysaccharide für die immunologischen Untersuchungen dar.

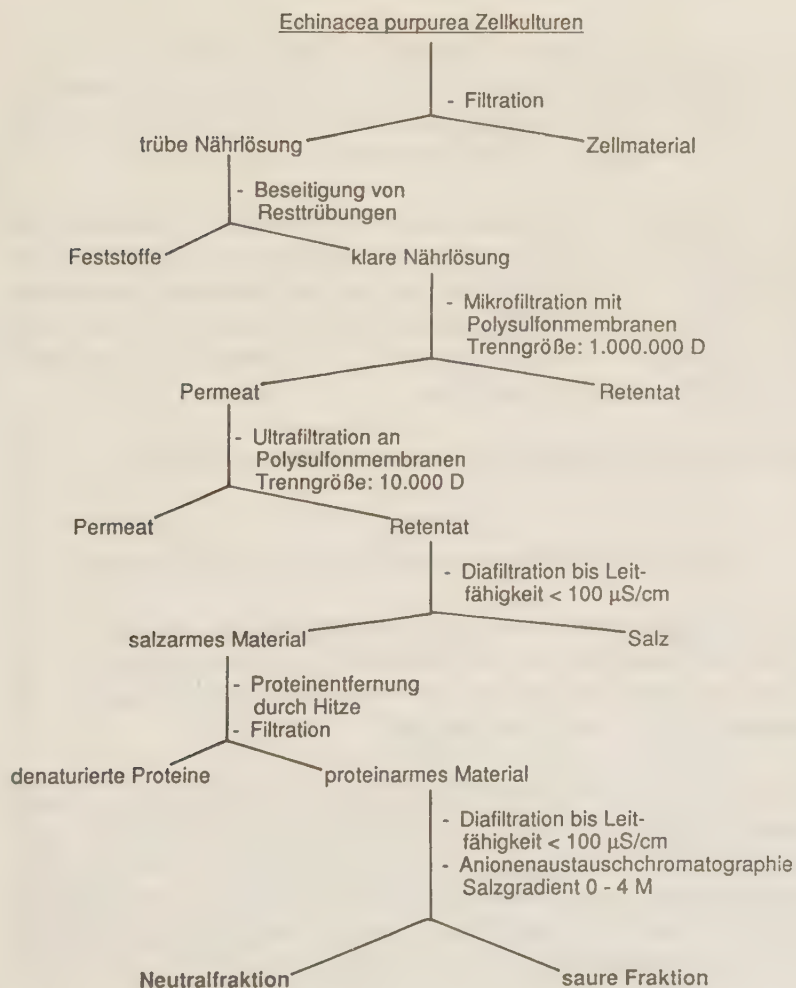


Abb. 41:

Isolierungsschema der Polysaccharide aus dem Nährmedium von *Echinacea purpurea* Zellkulturen im großtechnischen Maßstab

3. Untersuchungen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Da die Induktion des Tumor-Nekrose-Faktors eine charakteristische Wirkeigenschaft des Arabinogalaktans darstellt, die bisher bei keinem anderen Polysaccharid in dieser Spezifität festgestellt werden konnte, lag es nahe, zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen den TNF-Test einzusetzen.

Bei einem Makromolekül vom Typ des Echinacea-Arabinogalaktans können verschiedene chemische bzw. chemisch-physikalische Merkmale die Wirkung bzw. potentielle Bindungsfähigkeit an bestimmte Membranrezeptoren von Makrophagen beeinflussen. In Frage kommen 1. das Molekulargewicht, 2. die Zuckerzusammensetzung, 3. die Bindungsverhältnisse, 4. der Verzweigungsgrad, 5. die Konformation der Zuckerketten und 6. der Gehalt an Alkali- und Erdalkalitionen.

Von diesen ließen sich die Parameter 2, 3, 4, und 6 am leichtesten untersuchen.

3.1. Einfluß von Zuckergehalt und -zusammensetzung auf die Wirksamkeit

Für die Zuckeranalysen führten wir die Neutralzuckeranteile der einzelnen Fraktionen in die Alditolacetatform über und quantifizierten sie gaschromatographisch. Der Uronsäuregehalt wurde nach BITTER und MUIR (1962) ermittelt, während die Proteinbestimmung nach LOWRY (1951) erfolgte.

Die Art der Aufarbeitung, mit ethanolischen Fällungen und anschließender Anionenaustauschchromatographie wie im Fall 3A DI oder durch Anreicherung über Ultra- und Diafiltration (UF/DF) mit anschließender Auftrennung an einer ZetaPrep-Anionenaustauscherkartusche wie bei SFA 26 0,5 N und SFA 26 4,0 N, schien die Aktivität im TNF-Test nicht zu beeinflussen. Über beide Wege konnte immunologisch wirksames Material erhalten werden.

Tabelle 40 a: Einfluß von Zuckergehalt und -zusammensetzung verschiedener Fraktionen aus großtechnischer Produktion auf die Wirksamkeit

Substanz	Bemerkungen	molare Zuckermengensatzung						ges. Urons.		Prot. %		TNF Test	
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	%	%	%	%	%
EN 1	Fucogalaktosyloglucan (STUPPNER)	---	0,1	Spur.	1,0	Spur.	0,27	1,5	---	---	---	n. t.	+++
AG	s. Arabinogalaktan (STUPPNER)	0,02	---	1,04	---	0,03	1,0	Spur.	16,0	Spur.	---	+++	+
3 A	Schüttelkultur, durch Alkohol- fällungen gewonnen	---	---	0,96	0,47	---	1,0	1,05	6,64	61,4	6,1	-	n. t.
3 A DI	Saure Fraktion aus 3 A, im Lab. am Anionenaustauscher getrennt	0,28	---	0,99	0,41	---	1,0	0,71	15,3	57,1	2,1	++	n. t.
Mü 10	Schüttelkultur, UF/DF 0,1µ	0,2	---	1,15	0,16	0,05	1,0	0,14	5,4	44,3	12,5	-	+++
Mü 14	Fermenterkultur, UF/DF >30 KD	0,07	---	0,94	0,40	0,07	1,0	0,63	56,1	10,9	14,4	+++	-
Mü 20	UF/DF >10KD, Ionenaustauscher	---	---	0,26	0,92	---	1,0	3,05	27,7	10,0	10,9	-	++
SFA 17 a 0,5 N	Schüttelkultur, UF/DF, dann Proteinfällung mit TCA	0,02	---	0,74	0,02	0,01	1,0	0,03	47,9	8,8	3,8	+	n. t.
SFA 17 0,5 N	Schüttelkultur, 30' 121°C term. Proteinentfern., UF/DF	0,01	---	0,61	0,02	0,01	1,0	0,07	51,2	46,2	3,7	+	n. t.
SFA 20 0,5 N	Reproduktion von SFA 17 0,5 N	0,03	---	0,87	0,02	---	1,0	0,05	68,1	18,0	3,3	-	n. t.
SFA 21 0,5 N	300 l Fermenterkultur, sonst wie SFA 17 0,5 N	0,02	---	0,84	---	---	1,0	0,02	69,3	13,0	9,5	-	n. t.

---: kein Gehalt, n. t.: nicht getestet, -: keine Stimulierung, + - +++: schwache bis sehr gute Stimulierung

Tabelle 40 b: Einfluß von Zuckergehalt und -zusammensetzung verschiedener Fraktionen aus großtechnischer Produktion auf die Wirksamkeit

Substanz	Bemerkungen	molare Zuckerzusammensetzung							ges.		Urons.		TNF	Gran.
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	%	%	%	%	Test	Test
SFA 21 4,0 N	wie SFA 21 0,5 N, aber stark saure Anionenaustauscherfrakt.	0,06	---	1,09	---	---	1,0	---	36,4	50,8	7,4	-	-	n. t.
SFA 26 0,5 N	300 l Fermenterkultur, anderes Ultrafiltrationsmodul, 14 d/4° C gelagert, 2 Anionenaustauscher in Reihe	0,02	---	0,81	0,02	0,01	1,0	0,03	61,2	20,8	11,6	+++	+++	n. t.
SFA 26 4,0 N	wie SFA 26 0,5 N, aber stark saure Anionenaustauscherfrakt.	0,05	---	0,80	0,01	0,01	1,0	0,02	55,2	21,5	6,8	++	++	n. t.
K7 300 0d	300 l Fermenterkultur, UF/DF,	---	0,03	0,72	0,39	0,03	1,0	0,68	41,5	19,2	14,0	+++	+++	-
K7 300 3d	Entnahme der Proben nach 0, 3,	---	0,04	0,79	0,47	0,04	1,0	0,76	36,9	23,5	11,7	+++	+++	-
K7 300 10d	10, 17 Tagen nach Beimpfen des Fermenters	---	0,06	0,73	0,55	0,10	1,0	0,86	49,5	34,0	10,2	+++	+++	n. t.
K7 300 17d		0,02	0,09	0,75	0,59	0,06	1,0	0,81	61,1	18,3	8,7	+++	+++	++
CH 56 NF	Sammelchargen, UF/DF, Anionen-	---	0,14	0,54	0,75	---	1,0	1,65	52,4	15,2	8,4	n. t.	n. t.	-
CH 57 NF	austauscher	---	0,23	0,60	1,24	---	1,0	2,17	58,6	14,7	7,6	n. t.	n. t.	+
CH 58 RPS	UF/DF	0,02	0,08	0,69	0,38	0,03	1,0	0,73	59,2	17,4	7,3	n. t.	n. t.	-
CH 59 RPS	300 l Fermenterkultur, UF/DF, 42 d bei -60° C tiefgefroren	Spur.	0,09	0,77	0,44	0,03	1,0	0,69	50,8	16,5	14,7	n. t.	n. t.	-

---: kein Gehalt, n. t.: nicht getestet, -: keine Stimulierung, + -- +++: schwache bis sehr gute Stimulierung

Wie aus Tabelle 40 ersichtlich, ließ sich aus der jeweiligen Zuckerzusammensetzung der Grad der pharmakologischen Wirksamkeit nicht ablesen. Auch zwischen dem Gehalt an Uronsäure und dem Proteinanteil konnte, wie z. B. ein Vergleich zwischen K7 300 10d und 3A DI zeigt, keine Korrelation zur Wirksamkeit hergestellt werden. Relativ ähnlich zusammengesetzte Fraktionen, wie SFA 26 0,5 N und SFA 26 4,0 N, erwiesen sich im TNF-Test entweder als gleich oder fast gleich wirksam oder zeigten völlig konträres Verhalten (SFA 26 0,5 N und SFA 20 0,5 N). Zurückführen ließen sich diese Unterschiede weder auf das eingesetzte Konservierungsmittel Trichlorbutanol, das gegenüber den als Positivkontrollen verwendeten LPS-Standards keinerlei Auswirkungen auf deren TNF-induzierendes Verhalten erkennen ließ, noch auf Ultrafiltrationsmodule unterschiedlicher Firmen. Auch eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure nach dem Ultrafiltrations- / Diafiltrationsvorgang zeigte gegenüber einer Denaturierung im Trockenschrank vor dem Konzentrierungsschritt in bezug auf die Aktivität keine Unterschiede (SFA 17 0,5 N und SFA 17 a 0,5 N).

Die Reproduzierbarkeit der Anreicherung wirksamer Fraktionen erwies sich daher als relativ schwierig (SFA 17 0,5 N und SFA 20 0,5 N). Um Anhaltspunkte zu erhalten, ab welchem Zeitpunkt während eines Fermenterlaufes aktives Material aufgefunden wird, das dann zum richtigen Zeitpunkt abgeerntet werden kann, wurden in regelmäßigen Abständen nach Überimpfung eines 300 l Fermenters, beginnend mit dem Tag 0 über 17 Tage Proben gezogen und untersucht (K7 300 0d - 17d). Alle Proben erwiesen sich als sehr aktiv, obwohl sich ihre Zusammensetzung im Verlauf des Fermentierungsprozesses erheblich geändert hatte. So nahm der Neutralzuckeranteil um 50 % zu, während der Proteingehalt um über 40 % sank und der Uronsäureanteil nach einem Maximalwert am 10. Tag wieder in den Bereich des Ausgangswertes zurückfiel.

Diese Ergebnisse belegen, daß der TNF-Aktivitätsgrad aus der Zuckerzusammensetzung der einzelnen Chargen nicht direkt abgelesen werden kann. Bei der weiteren Optimierung des Aufarbeitungsweges verzichteten wir daher auf die Bestimmung der Zuckerzusammensetzung der einzelnen Fraktionen.

3.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Nachdem die qualitativen und quantitativen Zuckeranalysen keine befriedigenden Resultate geliefert hatten, wurden von vier verschiedenen Fraktionen, deren TNF-Aktivitäten von (-) bis (+++) reichten, ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen. Den wegen zahlreicher sich teilweise überlagernder Signale wenig aussagekräftigen Bereich zwischen 60 ppm und 85 ppm ließen wir bei unsere Betrachtung außer acht. Stattdessen konzentrierten wir uns vorwiegend auf Signale zwischen 15 und 25 ppm, die von dem Kohlenstoffatom C-6 der Fucose bzw. der CH_3 -Gruppe der Acetylgruppen des Fucogalaktosyloglucan stammen mußten, auf Resonanzen im Bereich der anomeren Kohlenstoffe zwischen 98 ppm bis ca. 111 ppm und auf Signale von Carbonylkohlenstoffen oberhalb von 170 ppm. Da STUPPNER (1985) eine genaue Zuordnung der einzelnen Signale für das Arabinogalaktan AG und das Fucogalaktosyloglucan EN 4 getroffen hatte, orientierten wir uns bei der Interpretation der aus Mischungen dieser Substanzen bestehenden Fraktionen CH-P NF/B 2/5/NF (I), CH-P/B 2/5/2,0 N (II), CH 80 III d RPS (III) und CH 80 III a RPS (IV) an seinen Angaben.

Mit Ausnahme der Fraktion II zeigte sich in den Spektren aller Polysaccharidgemische eine deutliche Resonanz bei 16,3 ppm die dem C-6 Atom der Fucose zuzuordnen ist. Gemisch IV zeigte zusätzlich mehrere Signale zwischen 20,1 ppm und 20,4 ppm, die von CH_3 -Gruppen stammen und gemeinsam mit Carbonylresonanzen bei 180 ppm im Spektrum IV die von STUPPNER beschriebenen Acetylgruppierungen im Fucogalaktosylan EN 4 bilden sollten. Bei STUPPNER fand sich bei 176 ppm ein entsprechendes Signal, das allerdings etwas zu höherem Feld verschoben war. In den Spektren I und III erschienen oberhalb von 140 ppm keinerlei Resonanzen, während Spektrum II zwar ein Signal bei 176,2 ppm aufwies, eine korrespondierende Resonanz der Methylgruppe jedoch nicht erkennen ließ. Die in den Spektren I, III und IV beobachtete chemische Verschiebung bei 23,7 ppm wurde von STUPPNER nicht beschrieben.

Das prägnanteste Signal im Bereich der anomeren Kohlenstoffe fand sich in den Spektren I, III und IV bei 99,7 ppm. Es sollte einer terminalen, α -verknüpften Xylose zuzuordnen sein. STUPPNER erkannte eine entsprechende Resonanz im Spektrum von EN 4 bei 99,16 ppm. Eine chemische Verschiebung in diesem Bereich wies auch Spektrum II auf, allerdings mit deutlich geringerer Intensität. Das größte

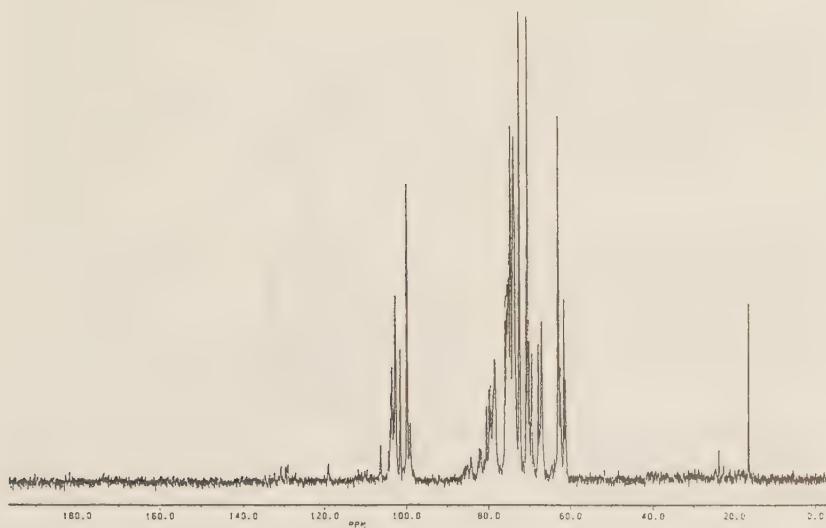


Abb. 42: ^{13}C -NMR-Spektrum der Fraktion I (CH-P NF/B 2/5/NF)

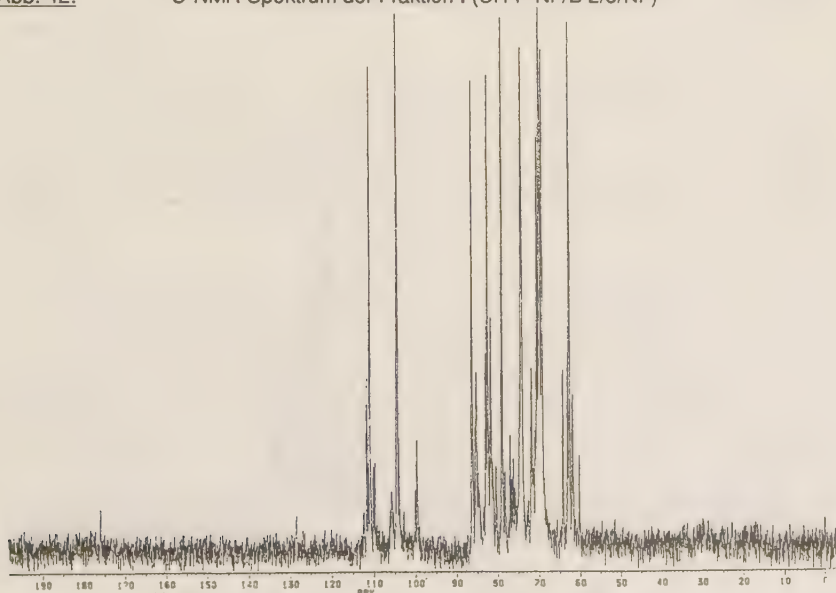


Abb. 43: ^{13}C -NMR-Spektrum der Fraktion II (CH-P/B 2/5/2,0 N)

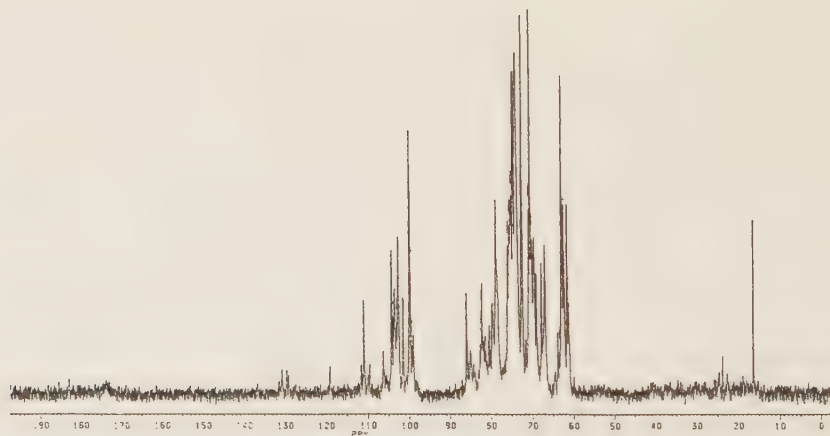


Abb. 44: ^{13}C -NMR-Spektrum der Fraktion III (CH 80 III d RPS)

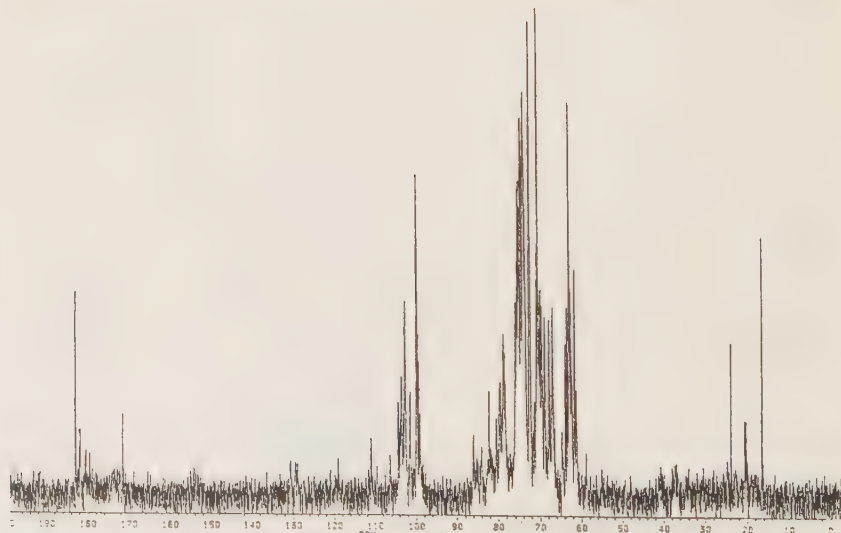


Abb. 45: ^{13}C -NMR-Spektrum der Fraktion IV (CH 80 III a RPS)

Signal in diesem Gemisch ließ sich bei 104,2 ppm erkennen. Es dürfte der (1→3)- β - oder (1→6)- β -gebundenen Galaktose bzw. ihrer (1,3,6)- β -verknüpften Form zugeordnet werden, wobei sich die Signale der anomeren Kohlenstoffe dieser Zucker nur geringfügig unterscheiden. STUPPNER nannte hier chemische Verschiebungen bei 103,71 ppm und 103,47 ppm. Die Resonanz bei 104,2 ppm fand sich auch in den Spektren I, III und IV wieder, jedoch mit deutlich abgeschwächter Intensität.

Das zweite deutliche Signal im anomeren Bereich von Spektrum II lag bei 110,94 ppm. Spektrum III wies eine weniger ausgeprägte Resonanz an gleicher Stelle auf, während eine chemische Verschiebung in den Spektren I und IV sich in diesem Bereich kaum aus dem Grundrauschen abhob. STUPPNER identifizierte diese Resonanz als anomeres Kohlenstoffatom einer aus dem Arabinogalaktan AG stammenden, endständigen Arabinofuranose.

Die Signale im Bereich zwischen 102,5 ppm und 103,4 ppm in den Spektren I, III und IV sollten den (1→4)- β - und (1,4,6)- β -gebundenen Glucoseres ten der Glucanhauptkette im Fucogalactoxyloglucan zugeordnet werden, für deren anomeres Kohlenstoffatom STUPPNER ein Signal bei 102,6 ppm nannte. Spektrum II zeigte in diesem Bereich keine Resonanzen.

Nach den ^{13}C -NMR-Spektren mußte man daher bei den Fraktionen III und IV auf das Vorliegen beider Polysaccharide schließen, wobei die Anteile des Fucogalactoxyloglucans jeweils überwogen. Fraktion I stellte ein relativ hochgereinigtes Fucogalactoxyloglucan dar, während Fraktion II das stark angereicherte Arabinogalaktan beinhaltet.

Die pharmakologischen Untersuchungen, die für das Rohpolysaccharid II im Gegensatz zur inaktiven Fraktion I eine gute TNF-Stimulierung lieferten, deckten sich gut mit den von STUPPNER für seine Polysaccharide bestimmten Aktivitäten. Nicht unseren Erwartungen entsprach allerdings das Verhalten der Fraktionen III und IV. Trotz einer offensichtlich ähnlichen Zusammensetzung erzielte das Rohpolysaccharid IV keine TNF-Freisetzung, wogegen Fraktion III eine Stimulierung in hohen Maße auslöste. Welche Ursachen diesem unterschiedlichen Verhalten zugrundelagen, ließ sich aus den ^{13}C -NMR-Spektren nicht entnehmen.

Die Signale der ^{13}C -NMR-Spektren erlaubten zwar wichtige Rückschlüsse auf charakteristische Strukturmerkmale einzelner Zuckerreste, Hinweise auf mögliche TNF-aktivierende Eigenschaften ließen sich aus ihnen jedoch nicht ableiten.

3.3. **Einfluß der Bindungsverhältnisse und des Verzweigungsgrades auf die TNF-Wirksamkeit**

Nachdem die ^{13}C -NMR-Spektroskopie keine Hinweise auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergeben hatte, versuchten wir, das saure Arabinogalaktan AG aus zwei unterschiedlich aktiven Rohpolysaccharidchargen der großtechnischen Herstellung nachzuisolieren und strukturell zu überprüfen, da möglicherweise in kleinen Strukturabweichungen die Ursache für die unterschiedliche Aktivität einzelner Chargen begründet lag. Wir wählten hierzu die aus einem relativ frühen Fermenterlauf gewonnene Fraktion **Mü 14** und ein aus den gepoolten **Chargen 89, 90, 92 - 99** entstandenes Rohpolysaccharidgemisch (Chargenpool) aus. Mü 14 zeigte sehr gute TNF-stimulierende Eigenschaften (+++), während der Chargenpool nur bei hoher Konzentration (10 mg / ml) eine schwache TNF-Sekretion induzierte (+).

3.3.1. Darstellung des Arabinogalaktans aus Fraktion Mü 14 und dem Chargenpool

Zur Abtrennung der neutralen Polymere chromatographierten wir die Rohpolysaccharidgemische an DEAE-Sepharose CL-6B Anionenaustauschermaterial und legten nach Elution mit Wasser einen linearen 0 bis 1 M Kochsalzgradienten an. Hierbei ließen sich bei Mü 14 zwei gut voneinander getrennte Fraktionen in einem Bereich von 0,02 bis 0,14 M und 0,2 bis 0,25 M NaCl auffangen, während aus dem Chargenpool neben zwei kleineren Peaks eine stark UV-aktive Fraktion die Hauptverbindung darzustellen schien. Vor der Chromatographie dialysiertes Material aus dem Chargenpool wies diesen Peak allerdings nicht mehr auf und zeigte nur noch die beiden anderen, sehr gut voneinander getrennten, symmetrischen Fraktionen in einem Bereich von 0,06 bis 0,38 M und 0,44 bis 0,63 M NaCl.

Nachdem jedoch nur die jeweils erste, saure Fraktion von Mü 14 und dem Chargenpool eine auch bei STUPPNEERS Arabinogalaktan AG beobachtete Linksdrehung zeigte und sie bei beiden Fraktionen auch den mengenmäßig größten Anteil stellte, konzentrierten wir uns bei der weiteren Reinigung auf diese Fraktion.

3.3.2. Reinigung durch Gelfiltrationschromatographie

Zur Abtrennung eventueller Verunreinigungen führten wir mit der ersten Anionenaustauscherfraktion beider Rohpolysaccharide eine Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S-400 HR durch und eluierten mit 0,2 M Kochsalzlösung. Beide Fraktionen lieferten über UV- und Refraktometerdetektion sowie Messung der optischen Drehung sehr symmetrische Peaks, ohne dabei jedoch eine Abtrennung nieder- oder hochmolekularer Verunreinigungen zu erreichen. Die Einheitlichkeit der Polysaccharide AG_{neu} aus Mü 14 und BAT 1 aus dem Chargenpool überprüften wir anschließend im HP-GPC-System.

3.3.3. Prüfung der Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 auf Homogenität; Molekulargewichtsbestimmung

Mit Hilfe der HP-GPC-Methode erhielten wir für beide Polysaccharide in einem 0,2 M Natriumphosphatpuffersystem sehr symmetrische Elutionsprofile, so daß AG_{neu} und BAT 1 als chemisch einheitliche Verbindungen betrachtet werden konnten (Abb. 46, 47).

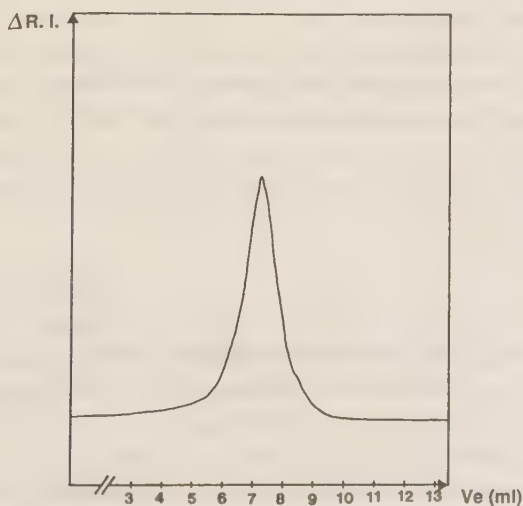


Abb. 46:

HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides AG_{neu}

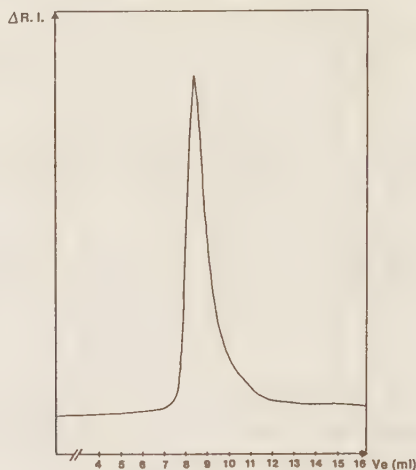


Abb. 47: HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides BAT 1

Die über HP-Gelpermeationschromatographie durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung mit einem nach steigendem Elutionsvolumen in Reihe geschalteten Säulensystem aus μ -Bondagel E-125 und μ -Bondagel E-500 ergab nach Eichung mit Glucose sowie den Dextranen 10 T, 40 T, 70 T, 110 T, 500 T und 2.000 T in einem 0,2 M Natriumphosphatpuffersystem pH 6,0 für AG_{neu} 100.000 D und für BAT 1 115.000 D. Das Molekulargewicht des erstmals von STUPPNER isolierten AG lag unter denselben Bedingungen bei 115.000 D (STUPPNER 1985).

3.3.4. Strukturaufklärung der Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1

3.3.4.1. Zuckeranalyse

Die über die Alditolacetate gaschromatographisch ermittelte molare Zusammensetzung ergab für AG_{neu} ein Verhältnis von Arabinose zu Galaktose wie 2 : 3, während diese beiden Zucker in BAT 1 im Verhältnis 1 : 1 vorlagen. Andere Neutralzucker ließen sich nur in sehr geringen Mengen nachweisen.

Der Uronsäuregehalt beider Polysaccharide lag mit 10,3 bzw. 12,3 % etwa in derselben Größenordnung. Die Proteinbestimmung lieferte mit 7,2 bzw. 8,8 % ebenfalls ähnliche Werte.

Tabelle 41: Zuckeranalysen der Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 im Vergleich zu AG

Molare Zuckerzusammensetzung:	AG _{neu}	BAT 1	AG
Rhamnose	0,02	0,02	0,02
Arabinose	0,67	1,0	1,04
Xylose	---	0,04	---
Mannose	---	0,01	0,03
Galaktose	1,0	1,0	1,0
Glucose	---	0,01	Spuren
Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962)	10,3 %	12,3 %	16,0 %
Proteingehalt nach LOWRY (1951):	7,2 %	8,8 %	Spuren

Die Neutralzuckerzusammensetzung des ursprünglichen AG deckte sich nahezu völlig mit derjenigen von BAT 1. Es wies jedoch einen etwas höheren Gehalt an Uronsäuren auf und enthielt, im Gegensatz zu den nachisolierten Verbindungen, nur sehr geringe Proteinanteile (STUPPNER 1989).

3.3.4.2. Aminosäureanalyse

Eine, nur für BAT 1 orientierend durchgeführte Aminosäureanalyse, zeigte die in Tabelle 42 wiedergegebene Zusammensetzung des Proteintanteiles.

Die größten Mengen entfielen auf Alanin und Serin, während Methionin und Tryptophan nicht nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich fanden sich 2,5 % Glucosamin, bezogen auf den Proteinanteil.

Tabelle 42: Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteiles von BAT 1

	%*		%*
Asparaginsäure	5,8	Methionin	---
Threonin	9,2	Isoleucin	2,8
Serin	12,1	Leucin	2,9
Glutaminsäure	4,0	Tyrosin	0,7
Prolin	4,5	Phenylalanin	1,1
Glycin	6,0	Histidin	1,4
Alanin	19,3	Tryptophan	---
Cystein	1,7	Lysin	2,3
Valin	5,2	Arginin	1,9

* bezogen auf den Proteinanteil

3.3.4.3. Pektinaseabbau

Entsprechend dem dünn-schichtchromatographischen Nachweis von Galakturonsäure nach Inkubation von AG_{neu} und BAT 1 mit Pektinase lag die Uronsäure jeweils in (1→4)- α -gebundener Form vor.

3.3.4.4. Methylierungsanalyse

Zur Ermittlung der Bindungsverhältnisse methylierten wir die Polysaccharide nach HAKOMORI (1964). Durch Vergleich der relativen Retentionszeiten und der Fragmentierungsmuster mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976), konnten wir die Verbindungen der einzelnen Peaks zuordnen (Tabelle 43).

Die Chromatogramme von AG_{neu} und BAT 1 wiesen übereinstimmend neun Peaks auf, die sich lediglich in ihrer Intensität unterschieden.

Die ersten fünf Peaks ließen sich als partiell methylierte Alditolacetate der Arabinose identifizieren. Diese Pentose mußte demnach als terminaler Zucker sowohl in furanosidischer (Peak 1: 1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-arabinitol) als auch in pyranosidischer Form (Peak 2: 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-arabinitol) vorgelegen haben.

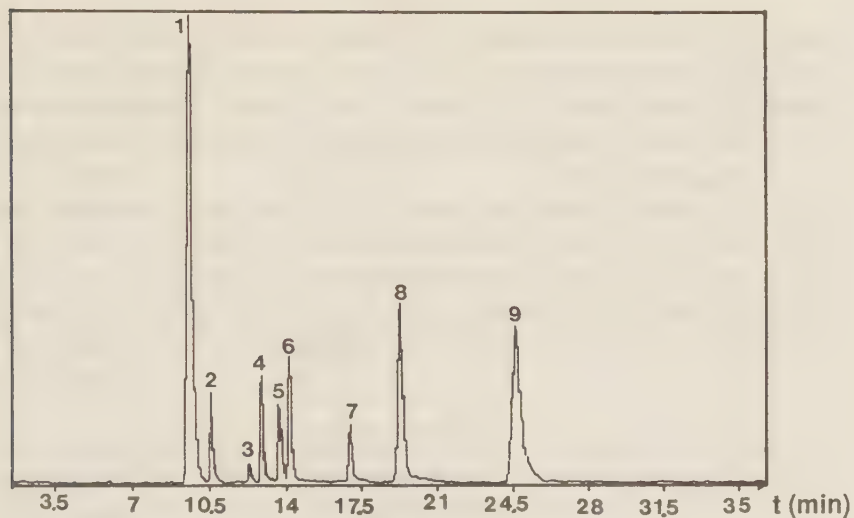


Abb. 48: GC der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides AG_{neu}

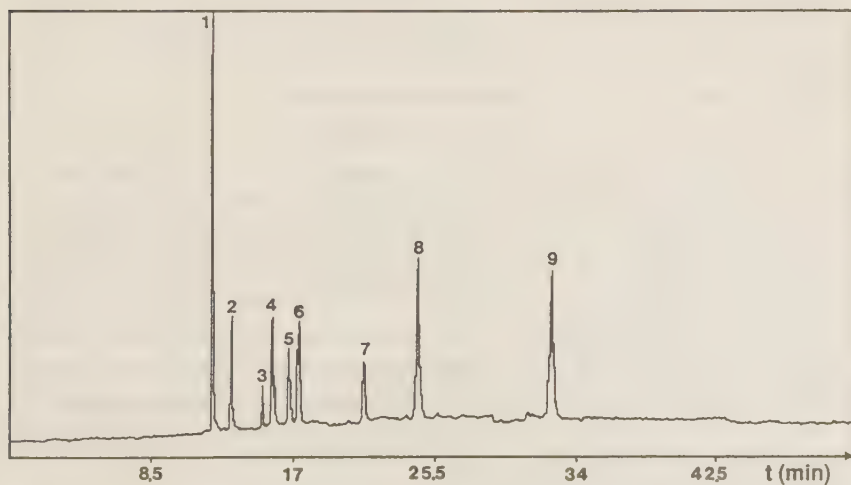


Abb. 49: GC der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharides BAT 1

Tabelle 43: Methylierungsanalysen der Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 im Vergleich zu AG

Peak	molare Zusammensetzung*			Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
	AG _{neu}	BAT 1	AG		
1	3,51	3,45	3,7	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	0,41	1,22	---	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 161
3	n. i.	0,21	---	1,2,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 129, 161, 189,
4	0,37	1,21	---	1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 201, 233
5	0,31	0,36	2,2	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161, 189
6	0,40	0,49	0,8	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
-	---	---	0,9	1,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -methyl-arabinitol	
7	0,23	0,46	0,7	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 201, 233, 277
8	1,0	1,0	1,0	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
9	0,91	3,22	4,0	1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,4-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 189, 201, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

Die kettenständige Arabinose zeigte folgende Bindungsverhältnisse: (1→2) Peak 3: 1,2,4-Tri-*O*-acetyl-3,5-di-*O*-methyl-arabinitol, (1→3) Peak 4: 1,3,4-Tri-*O*-acetyl-2,5-di-*O*-methyl-arabinitol und (1→5) Peak 5: 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-arabinitol. Verzweigungsstellen dieser Pentose fanden wir nicht.

Die Verbindungen der Peaks 6 bis 9 stellten Derivate der Galaktose dar. Peak 6 identifizierten wir als 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol und stammte daher von einer nicht reduzierenden, endständigen Galaktose. Die Peaks 7 und 8 sprachen mit einem 1,3,5-Tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-galaktitol bzw. einem 1,5,6-Tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-galaktitol für eine (1→3)- bzw. (1→6)-Verknüpfung dieser Hexose.

Die Interpretation des Fragmentierungsschemas der Verbindung von Peak 9 ergab ein 1,3,5,6-Tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-galaktitol und wies damit auf das Vorliegen einer (1,3,6)-Verzweigungsstelle dieses Zuckers hin.

Teilweise erheblich abweichende Resultate zeigten AG_{neu} und BAT 1 in der molaren Zusammensetzung ihrer partiell methylierten Alditolacetate. BAT 1 wies im Vergleich zu AG_{neu} die ca. dreieinhalbfache Menge an Galaktoseverzweigungsstellen auf, enthielt doppelt soviel endständige Galaktosen und einen dreimal so hohen Anteil an terminalen Arabinopyranosen. Zusätzlich führte es die (1→3)-gebundene Form dieser Pentose in dreifacher Menge. Die restlichen partiell methylierten Alditolacetate von AG_{neu} und BAT 1 zeigten in etwa gleiche molare Anteile.

Diese Ergebnisse ließen sowohl qualitative wie quantitative Unterschiede zum ursprünglichen AG erkennen. Bei diesem fehlten terminale Arabinopyranosen sowie (1→2)- und (1→3)-gebundene, kettenständige Arabinosen. Zusätzlich enthielt es jedoch die in AG_{neu} und BAT 1 nicht identifizierte (1,3,5)-Verzweigungsstelle dieser Pentose. Seine Zusammensetzung zeigte einen im Vergleich zu BAT 1 um 25 % erhöhten Gehalt an (1,3,6)-verzweigter Galaktose, einen 40 % höheren Anteil an (1→3)-gebundener Galaktose sowie um 60 % erhöhte Werte an terminaler Galaktose und mehr als die sechsfache Menge an (1→5)-verzweigter Arabinose.

Nach diesen Untersuchungen handelt es sich bei AG_{neu} und BAT 1 um Arabinogalaktane mit einer (1,3,6)-verknüpften Galaktanhauptkette, die sich von AG hauptsächlich im Arabinoseanteil unterscheiden. Während AG eine komplexe Arabinanstruktur

besitzt, deuteten die Methylierungsanalysen von AG_{neu} und BAT 1 eher auf kürzere, lineare Arabinanseitenketten hin und legten die Vermutung nahe, daß der größte Teil dieser Pentose in terminaler, furanosidischer Form direkt an das Galaktangrundgerüst gebunden vorliegt.

3.3.4.5. ¹³C-NMR-Spektroskopie

Zur Auswertung der Kernresonanzspektren von AG_{neu} und BAT 1 zogen wir die ¹³C-NMR-Daten von Modellsubstanzen (COLLINS *et al.* 1981b, KOVAC *et al.* 1984, GORIN *et al.* 1975, BREITMAIER *et al.* 1973) sowie von (1,3,6)-gebundener Galaktose und terminaler Arabinofuranose aus dem Weinbeerenmark-Arabinogalaktan heran (SAULNIER *et al.* 1988).

Im Bereich der anomeren Kohlenstoffe zeigte das Spektrum des Polysaccharides AG_{neu} neben einem scharfen Signal bei 110,27 ppm nur noch eine Reihe schlecht aufgelöster Resonanzen bei 104 ppm, von denen nur zwei bei 104,4 und 104,14 ppm etwas abgetrennt erschienen. Nachdem sich der Neutralzuckeranteil von AG_{neu} zum größten Teil aus nur zwei verschiedenen Zuckern zusammensetzte, ordneten wir die Signale im Bereich von 104 ppm β -verknüpfter Galaktopyranose und die Resonanz bei 110,27 ppm dem C-1 Atom einer α -gebundenen Arabinofuranose zu.

Neben dem anomeren Kohlenstoffatom bei 104,40 ppm identifizierten wir die Signale der restlichen C-Atome 2, 3, 4, 5 und 6 der (1 $\rightarrow$ 3)- β -gebundenen Galaktose bei 70,91 ppm, 81,14 ppm, 69,51 ppm, 76,14 ppm und 61,96 ppm. Sie stimmten sehr gut mit den Resonanzen des Galaktosylrestes B eines von COLLINS beschriebenen Tetrasaccharides überein. In gleicher Weise deckten sich die Signale des Galaktosylrestes A eines von KOVAC angegebenen Disaccharides mit den Resonanzen, die wir den Kohlenstoffatomen C-2, C-3, C-4, C-5 und C-6 von (1 $\rightarrow$ 6)- β -verknüpfter Galaktose bei 70,91 ppm, 73,69 ppm, 69,51 ppm, 74,52 ppm und 69,68 ppm zuordneten. Die Signale von (1,3,6)- β -gebundener Galaktose lagen bei 104,14 ppm (C-1), 70,91 ppm (C-2), 81,14 ppm (C-3), 69,51 ppm (C-4), 74,52 ppm (C-5) und 69,68 ppm (C-6). Sie korrelierten ausgezeichnet mit den entsprechenden Resonanzen der (1,3,6)- β -gebundenen Galaktose aus dem Weinbeerenmark-Arabinogalaktan nach SAULNIER. Er fand sie für C-1 bei 104,2 ppm, für C-3 bei 81,1 ppm und für C-6 bei 69,3 ppm. Einige Signale ordneten wir mehrfach zu, da sie teilweise mit den Resonanzen anders verknüpfter Galaktosen überlappten.

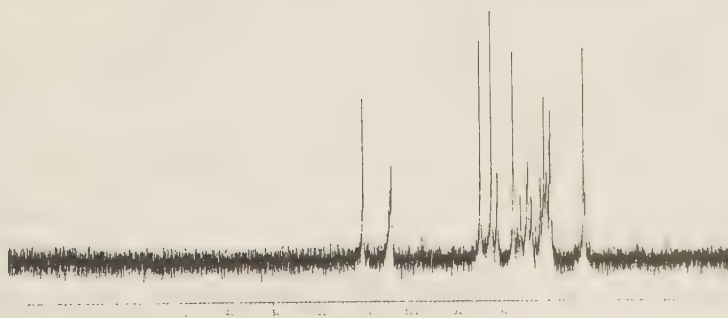


Abb. 50: ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharides AG_{neu}

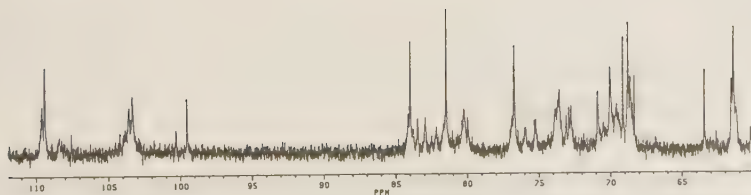


Abb. 51: ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharides BAT 1

Tabelle 44: ^{13}C -NMR-Daten der Galaktanteile der Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 im Vergleich zu einem Galaktose-Oligosaccharid (COLLINS *et al.* 1981b), einem Galaktose-Disaccharid (KOVAC *et al.* 1984) und (1,3,6)-verknüpfter Galaktose im Arabinogalaktan aus Weinbeerenmark (SAULNIER *et al.* 1988)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal-R}$						
nach COLLINS	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal-R}$						
in AG_{neu}	104,40	70,91	81,14	69,51	76,14	61,96
in BAT 1	103,53	70,01	80,24	68,61	75,3	61,16
$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow\text{CH}_3)$						
nach KOVAC	104,0	70,9	72,8	68,8	73,9	69,0
$\text{R}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}(1\rightarrow\text{R})$						
in AG_{neu}	104,40	70,91	73,69	69,51	74,52	69,68
in BAT 1	103,53	70,01	72,73	68,61	73,61	68,76
(1,3,6)-verknüpfte- $\beta\text{-D-Galaktose}$						
nach SAULNIER	104,2	71,8	81,1	n. z.	74,7	69,3
(1,3,6)-verknüpfte- $\beta\text{-Galaktose}$						
in AG_{neu}	104,14	70,91	81,14	69,51	74,52	69,68
in BAT 1	103,27	70,01	80,24	68,61	73,84	68,76

n. z.: nicht eindeutig zuzuordnen

Für die Interpretation der Signale der Arabinose zogen wir entsprechende Daten für ein Methyl- $\alpha\text{-L-arabinofuranosid}$ (BREITMAIER *et al.* 1973), ein Methyl- $\beta\text{-L-arabinopyranosid}$ (GORIN *et al.* 1975) und eine endständige $\alpha\text{-Arabinofuranose}$ in einem Arabinogalaktan aus dem Mark von Weinbeeren (SAULNIER *et al.* 1988) heran.

Tabelle 45: ^{13}C -NMR-Daten der Arabinanteile der Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 im Vergleich zu Methyl- β -L-arabinopyranosid (GORIN *et al.* 1975), Methyl- α -L-arabinofuranosid (BREITMAIER *et al.* 1973) und terminaler, α -verknüpfter Arabinofuranose im Arabinogalaktan aus Weinbeerenmark (SAULNIER *et al.* 1988)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
β -L-Arap(1 $\rightarrow$ CH ₃ nach GORIN	101,0	69,4	69,9	70,0	63,8
β -Arap(1 $\rightarrow$ R in BAT 1	99,50	68,32	68,76	69,11	63,42
α -L-Araf(1 $\rightarrow$ CH ₃ nach BREITMAIER	109,5	82,0	77,9	84,9	62,5
α -L-Araf(1 $\rightarrow$ R nach SAULNIER	109,9	82,3	77,8	84,9	62,3
α -Araf(1 $\rightarrow$ R in AG_{neu}	110,27	82,37	77,61	84,87	62,30
in BAT 1	109,38	81,48	76,72	83,98	61,41

Deutlich treten im Spektrum von BAT 1 neben dem Signal bei 100,38 ppm Resonanzen mit hoher Intensität bei 64,3 ppm, 69,2 ppm, 69,64 ppm und 70,0 ppm hervor. Diese Signale ordneten wir den Kohlenstoffatomen C-5, C-2, C-3 und C-4 des nicht anomeren Bereiches einer endständigen, β -gebundenen Arabinopyranose zu. Insbesondere das sehr scharfe, einzelne Signal des anomeren Kohlenstoffatoms sprach für die Bindung der Arabinose in dieser Form an stets dieselbe Verknüpfungsstelle.

In gleich guter Weise deckten sich auch die Signale des Galaktanteiles von BAT 1 mit den Referenzdaten. Die Resonanzen dieses Polysaccharides lagen jedoch aufgrund eines ungenau gesetzten Standards durchweg um 0,9 ppm zu höherem Feld verschoben vor.

In BAT 1 konnten die Signale 103,53 ppm, 70,01 ppm, 80,24 ppm, 68,61 ppm, 75,3 ppm und 61,16 ppm den Kohlenstoffatomen C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 und C-6 der (1→3)- β -gebundenen Galaktose zugeordnet werden, während für die entsprechenden Atome der (1→6)- β -verknüpften Galaktose chemische Verschiebungen bei 103,53 ppm, 70,01 ppm, 72,73 ppm, 68,61 ppm, 73,61 ppm und 68,76 ppm auftraten. In (1,3,6)- β -gebundener Form ergaben die Kohlenstoffatome dieses Zuckers Signale bei 103,27 ppm (C-1), 70,01 ppm (C-2), 80,24 ppm (C-3), 68,61 ppm (C-4), 73,84 ppm (C-5) und 68,76 ppm (C-6). Einige Resonanzen mußten wiederum mehreren unterschiedlich verknüpften Galaktosen zugeordnet werden.

Die Kohlenstoffatome der terminalen α -gebundenen Arabinofuranose im Polysaccharid AG_{neu} ergaben Signale bei 110,27 ppm (C-1), 82,37 ppm (C-2), 77,61 ppm (C-3), 84,87 ppm (C-4) und 62,30 ppm (C-5). Die Resonanzen der entsprechend verknüpften Arabinose in BAT 1 fanden sich für die Atome C-1, C-2, C-3, C-4 und C-5 bei 109,38 ppm, 81,48 ppm, 76,72 ppm, 83,98 ppm und 61,41 ppm. Ihre gute Übereinstimmung mit den Daten der Referenzverbindungen zeigt Tabelle 45. Im Spektrum von BAT 1 fanden wir zusätzlich Signale, die das bereits in der Methylierungsanalyse angedeutete Vorliegen von endständiger Arabinopyranose in β -Konfiguration bestätigten. Entsprechende Resonanzen bei 99,50 ppm, 68,32 ppm, 68,76 ppm, 69,11 ppm und 63,42 ppm sollten von den Kohlenstoffen C-1, C-2, C-3, C-4 und C-5 stammen.

Signale für kettenständige Arabinoseeinheiten und endständige Galaktosereste in AG_{neu} und BAT 1 sowie für terminale Arabinopyranosemoleküle in AG_{neu} ließen sich aufgrund ihres geringen Gehaltes in den jeweiligen Spektren nicht eindeutig zuordnen.

Mit Ausnahme der zusätzlichen Signale für endständige Arabinopyranose wiesen beide Spektren dieselben Resonanzen auf und unterstrichen die bereits durch die Ergebnisse der Methylierungsanalyse dokumentierte nahe Verwandtschaft der beiden Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von AG ließ im Galaktangrundgerüst keine Unterschiede zu den oben genannten Verbindungen erkennen. Abweichungen zeigte allerdings der Arabinanteil. Deutlich abgesetzte Signale für (1→5)-gebundene Arabinose mit einer Resonanz für das anomere Kohlenstoffatom bei 107,79 ppm, wie sie im Spektrum von

AG vorliegen, fehlten bei AG_{neu} und BAT 1 völlig. Demgegenüber fanden sich im ¹³C-NMR-Spektrum von AG nur Signale mit sehr geringer Intensität, die von endständiger, β -gebundener Arabinopyranose stammen könnten und eine eindeutige Zuordnung nicht erlauben. Die Methylierungsanalyse von AG hatte keinen Hinweis auf das Vorliegen von Arabinose in dieser Form geliefert (STUPPNER 1985).

Da der Arabinanteil aufgrund der übereinstimmend guten Aktivitäten von AG_{neu} und AG für die TNF-stimulierende Wirkung offenbar keine Rolle spielt, die in der Zusammensetzung des Galaktangerüsts ähnlichen Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 jedoch eine unterschiedlich starke Sekretion induzieren, führten wir die weiteren Untersuchungen, die sich besonders auf das Galaktangrundgerüst richteten, nur noch mit BAT 1 durch.

3.3.4.6. Partialhydrolyse des Polysaccharides BAT 1

Zur partiellen Depolymerisation hydrolysierten wir mit 0,05 M Trifluoressigsäure und untersuchten das Gemisch anschließend dünnschichtchromatographisch. Neben einer starken Bande in Höhe der Arabinosevergleichslösung fanden sich mehrere Zonen im Bereich der Oligosaccharide. Galaktose ließ sich nur in sehr geringer Konzentration nachweisen.

Tabelle 46: Zuckeranalyse des Partialhydrolysates BAT 1P

Molare Zuckerzusammensetzung:

Rhamnose	0,02
Arabinose	0,13
Xylose	0,04
Galaktose	1,0
Glucose	Spuren

Uronsäuregehalt nach BITTER u. MUIR (1962)	26,8 %
---	--------

Proteingehalt nach LOWRY (1951):	9,7 %
-------------------------------------	-------

Zur Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile dialysierten wir das Hydrolyseprodukt BAT 1P erschöpfend gegen demineralisiertes Wasser. Die anschließend nach Totalhydrolyse ermittelte Zuckerzusammensetzung ließ nur noch geringe Anteile an Arabinose erkennen. Die Protein- und besonders die Uronsäurewerte waren jedoch, entsprechend des jetzt geringeren Molekulargewichtes, angestiegen.

3.3.4.7. Methylierungsanalyse von BAT 1P

Die nach HAKOMORI (1964) durchgeführte Methylierungsanalyse von BAT 1P zeigte ein Gaschromatogramm, das sieben Peaks aufwies. Die Interpretation führte nach Vergleich der relativen Retentionszeiten und der GC-MS-Spektren mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976) zu folgenden Ergebnissen:

Arabinose lag nur noch als terminale Furanose und Pyranose sowie (1→3)-verknüpft vor. Dies ergab die Interpretation der von 1,4-Di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-arabinitol, 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-arabinitol und 1,3,4-Tri-*O*-acetyl-2,5-di-*O*-arabinitol stammenden GC-MS-Zerfallsmuster der Verbindungen der Peaks 1, 2 und 3.

Keine qualitativen Veränderungen stellten wir bei den Bindungsverhältnissen der Galaktose bei BAT 1P im Vergleich zu BAT 1 fest. Die Hexose lag noch immer als endständiger Zucker, (1→3)- und (1→6)-verknüpft sowie (1,3,6)-gebunden vor. Entsprechende Rückschlüsse ließen die Fragmentierungen der partiell methylierten Alditolacetate der Peaks 2, 3, 4 und 6 zu. Sie mußten von 1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galaktitol, 1,3,5-Tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-galaktitol, 1,5,6-Tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-galaktitol und 1,3,5,6-Tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-galaktitol stammen.

Starke Veränderungen zeigten sich jedoch in der quantitativen Zusammensetzung. Wir beobachteten eine in Relation zum genuinen BAT 1 drastische Verringerung des Anteils an (1,3,6)-verknüpfter Galaktose auf ein Drittel, verbunden mit einem gleichzeitigen Anstieg der Menge der (1→6)-verknüpften Form um das 2,2-fache. Ihr im Nativpolysaccharid noch bei 2,17 : 1 liegendes Verhältnis zur (1→3)-gebundenen Galaktose war in BAT 1P auf ca. 4,8 : 1 verschoben. Gleichzeitig hatte sich der Gehalt an endständiger Galaktose um das Zweieinhalbfache erhöht. Verglichen mit

BAT 1 lag der Anteil an terminaler Arabinopyranose in BAT 1P um etwa denselben Faktor reduziert vor. Neben einem Fünftel der genuin aufgefundenen Menge an endständiger Arabinofuranose fanden sich nur noch 27 % des ursprünglichen Gehaltes an (1→3)-gebundener Pentose.

Arabinose schien demnach bevorzugt in Position C-3 der (1,3,6)-verknüpften Galaktose gebunden vorzuliegen. Daneben sollte sie jedoch auch in Position C-6 einiger (1→6)-verknüpften Galaktosereste anzutreffen sein.

Tabelle 47: Methylierungsanalyse des Partialhydrolyseproduktes BAT 1P

Peak	molare Zusammensetzung* BAT 1P	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	1,56	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	1,06	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 161
3	0,71	1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 201, 233
4	2,48	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
5	1,0	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 201, 233, 277
6	4,76	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
8	2,30	1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,4-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 189, 201, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

3.3.4.8. Reduktion der Galakturonsäure von BAT 1P

Die Reduktion der Galakturonsäure führten wir nach der Methode von UKAI und Mitarbeitern (1977) durch.

Tabelle 48: Methylierungsanalyse des carboxylreduzierten Partialhydrolyseproduktes BAT 1PR

Peak	molare Zusammensetzung* BAT 1PR	Alditolacetate	charakt. Bruchstücke (m/e)
1	1,56	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 101, 117, 129, 161
2	1,06	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-arabinitol	101, 117, 161
3	0,71	1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl-arabinitol	87, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 201, 233
4	2,48	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
5	1,0	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 201, 233, 277
6	4,76	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
7	1,45	1,4,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol-6,6- d_2	87, 101, 117, 129, 161, 203, 263
8	2,30	1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,4-di- <i>O</i> -methyl-galaktitol	87, 99, 101, 117, 129, 189, 201, 233

* Korrigierte Werte nach SWEET *et al.* (1975)

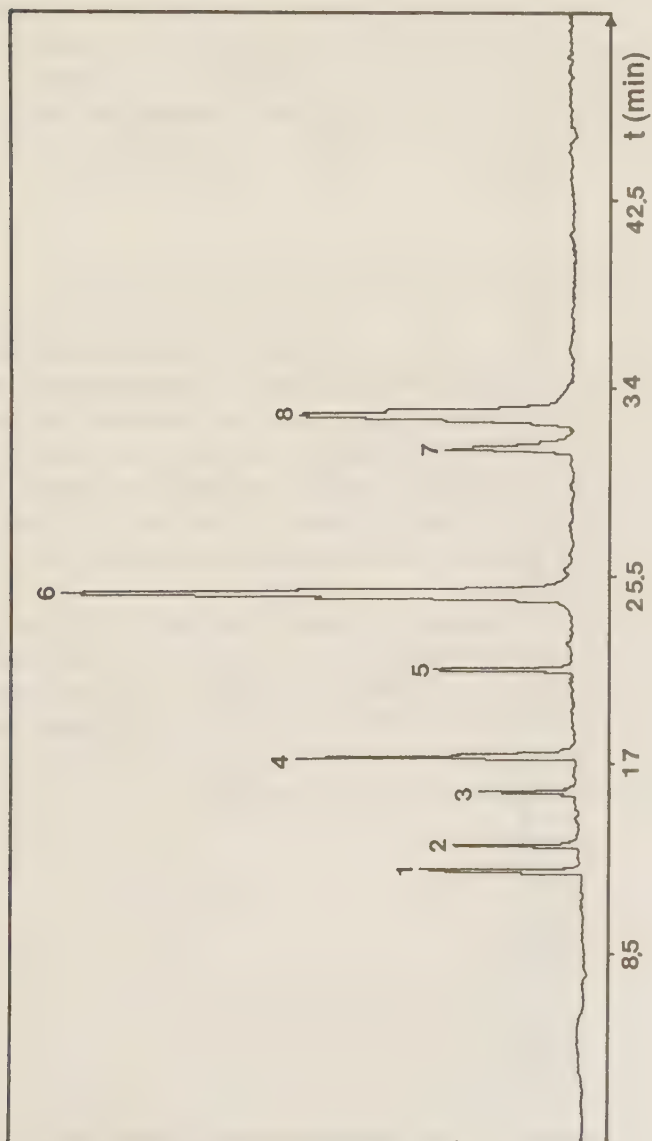


Abb. 52: Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des reduzierten Partialhydrolysates BAT 1PR

Das Chromatogramm einer GC-MS-Analyse von BAT 1P nach Methylierung, Carboxylreduktion und anschließender Überführung der Hydrolyseprodukte in die Alditolacetatform zeigte einen zusätzlichen Peak mit einem Fragmentierungsmuster, das nur einem 1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-galaktitol-6,6- d_2 zuzuschreiben war. Dieses Derivat mußte aus einer (1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Galakturonsäure stammen. Ihr Vorliegen in dieser Bindungsart hatte bereits der Pektinaseabbau in E.3.2.4.3. angedeutet.

3.3.4.9. ^{13}C -NMR-Spektroskopie des partiellen Hydrolyseproduktes BAT 1P

Das im Vergleich zu BAT 1 wesentlich vereinfachte ^{13}C -NMR-Spektrum von BAT 1P zeigte im Bereich der anomeren Kohlenstoffe nur noch ein Signal bei 103,41 ppm. Da der größte Teil der im Galaktangrundgerüst nach den Ergebnissen der Methylierungsanalyse in vier Bindungsarten auftretenden Galaktose (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpft vorlag, führten wir dieses Signal auf das C-1 Atom der entsprechend gebundenen Hexose zurück und ordneten die sehr intensiven Signale bei 70,83 ppm, 72,74 ppm, 69,39 ppm, 73,80 ppm und 68,75 ppm den Kohlenstoffen C-2, C-3, C-4, C-5 und C-6 zu.

Das Fehlen zusätzlicher Resonanzen im anomeren Bereich legte die Vermutung nahe, daß auch die C-1 Signale der endständigen, (1 $\rightarrow$ 3)-gebundenen und (1,3,6)-verzweigten Galaktosen bei 103,41 ppm zusammengefallen sein mußten. Die genaue Interpretation des nicht anomeren Bereiches im Spektrum von BAT 1P mit den Signalen entsprechender Modellsubstanzen findet sich in Tabelle 49. Es ließ sich eine sehr gute Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen feststellen.

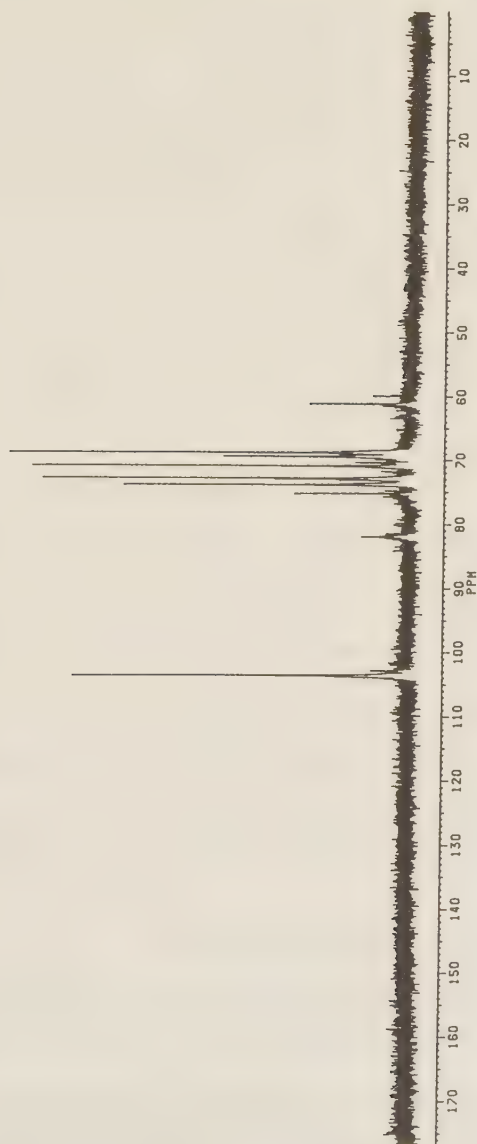


Abb. 53: ^{13}C -NMR-Spektrum des partialhydrolysierten Polysaccharides BAT 1P

Tabelle 49: ^{13}C -NMR-Daten des Partialhydrolyseproduktes BAT 1P im Vergleich zu einem Galaktose-Oligosaccharid (COLLINS *et al.* 1981b), einem Galaktose-Disaccharid (KOVAC *et al.* 1984), Methyl- β -D-galaktopyranosid (GORIN *et al.* 1975) und (1,3,6)- β -verknüpfter Galaktose im Arabinogalaktan aus dem Weinbeerenmark (SAULNIER *et al.* 1988)

Substanz	Chem. Verschiebungen in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal-R nach COLLINS	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal-R in BAT 1P	103,41	70,83	81,89	69,39	75,16	61,07
β -Gal(1 $\rightarrow$ 6)- β -Gal(1 $\rightarrow$ CH ₃) nach KOVAC	104,0	70,9	72,8	68,8	73,9	69,0
R $\rightarrow$ 6)- β -Gal(1 $\rightarrow$ R in BAT 1P	103,41	70,83	72,74	69,39	73,80	68,75
β -D-Gal(1 $\rightarrow$ CH ₃ nach GORIN	104,9	71,8	73,9	69,8	76,2	62,1
β -Gal(1 $\rightarrow$ R in BAT 1P	103,41	70,83	72,90	69,39	75,16	61,07
(1,3,6)-verknüpfte- β -D-Galaktose nach SAULNIER	104,2	71,8	81,1	70,3	74,7	69,3
(1,3,6)-verknüpfte- β -Galaktose in BAT 1P	103,41	70,83	81,89	70,32	73,80	68,75

3.3.4.10. Strukturvorschlag für das Polysaccharid BAT 1

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse sollte es sich bei BAT 1 um ein Proteoglykan aus der Gruppe der Arabino-3,6-galaktan-Proteine handeln (STEPHEN 1983c).

Die Hauptkette dürfte sich aus (1 $\rightarrow$ 3)- β -gebundenen Galaktoseeinheiten zusammensetzen, die zu etwa 80 % Verzweigungsstellen in Position C-6 aufweisen. An diese sind kurze Seitenketten aus (1 $\rightarrow$ 6)- β -verknüpften Galaktoseresten gebunden, die in

Position C-3 und C-6 Verknüpfungspunkte zu kurzen, (1→3)- α -gebunden Arabinofuranoseketten tragen oder alternativ auch in Position C-6 terminale, β -verknüpfte Arabinopyranosen besitzen.

Die in der Neutralzuckerbestimmung nachgewiesene geringe Menge an Rhamnose reichte nicht aus, um deren Bindungsverhältnisse in den Methylierungsanalysen zu bestimmen. Da für die Galakturonsäure keine Verzweigungsstelle ermittelt werden konnte und in sauren Arabino-3,6-galaktan-Proteinen der Galakturonanteil üblicherweise über Rhamnosereste mit dem Arabinogalaktanteil verbunden vorliegt, gelang es uns nicht, die Verknüpfungsstelle zu klären.

Abbildung 54 gibt einen von mehreren möglichen Strukturvorschlägen für das Polysaccharid BAT 1 wieder.

BAT 1

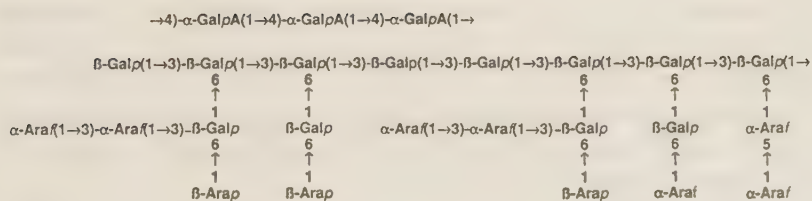


Abb. 54: Strukturvorschlag für das Polysaccharid BAT 1

Im Unterschied zu BAT 1 sollte AG_{neu} einen etwas niedrigeren Verzweigungsgrad der Hauptkette aufweisen und eine geringere Anzahl an Arabinanseitenketten enthalten. Terminale Arabinofuranosen scheinen in diesem Polysaccharid zum größten Teil direkt an das Galaktangrundgerüst zu binden.

3.3.5. Diskussion der strukturellen Unterschiede zwischen den nachisolierten Polysacchariden und AG

Größere Differenzen im Molekulargewicht ließen sich zwischen den Polysacchariden mit 100.000 D für AG_{neu}, 115.000 D für BAT 1 und 115.000 D für AG nicht erkennen. Unterschiede konnten allerdings im Proteingehalt festgestellt werden. AG wies nur einen vernachlässigbaren Proteinanteil auf (STUPPNER 1989), während AG_{neu} und BAT 1 mit 7,2 % bzw. 8,8 % jeweils größere Mengen enthielten.

Strukturelle Abweichungen ergaben sich auch aus den Methylierungsanalysen. Der für AG charakteristische, komplexe Arabinanteil ließ sich weder in AG_{neu} noch in BAT 1 nachweisen. Demgegenüber zeigten die beiden nachisolierten Polysaccharide endständige, β -verknüpfte Arabinopyranoseeinheiten sowie kettenständige, (1 $\rightarrow$ 3)- α -gebundene Arabinofuranoseresste, für deren Vorliegen in AG die Strukturaufklärung von STUPPNER keinerlei Anhaltspunkte lieferte.

Eine Hauptursache für die etwas differierenden Strukturen der nachisolierten Polysaccharide im Vergleich zur ursprünglichen Verbindung könnte in einem anderen Erntezeitpunkt der Zellkulturen zu suchen sein. Wie die Zuckeranalysen der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben bereits ergeben hatten, unterliegen die Parameter Neutralzuckergehalt, Uronsäure- und Proteingehalt während der Fermentationsdauer erheblichen Schwankungen.

Ein Zusammenhang zwischen den oben beschriebenen Strukturabweichungen und dem unterschiedlichen Verhalten der Polysaccharide im TNF-Test muß allerdings bezweifelt werden. Daß der verschiedenartige Aufbau der Seitenketten nicht allein über die Aktivität entscheidet, zumal das Grundgerüst der drei Verbindungen große Ähnlichkeit aufweist, deuten die annähernd gleichen TNF-Induktionen durch AG und AG_{neu} an. Auch ein variierender Proteingehalt übt nach den Ergebnissen des Screenings weder positive noch negative Einflüsse aus. Die etwa gleich guten TNF-

induzierenden Eigenschaften der Polysaccharide AG_{neu} und AG im Gegensatz zum äußerst schwach aktiven BAT 1 müssen daher auf eine andere gemeinsame Ursache zurückzuführen sein.

3.4. Bestimmung des Alkali- und Erdalkaliionengehaltes

Da das Arabinogalaktan freie Säuregruppen enthält, schien ein Beeinflussung der TNF-Freisetzung durch Salzbildung mit Alkali- und Erdalkaliionen, wie sie im Nährmedium in reichem Maße vorliegen, denkbar. Aus diesem Grund wurden verschiedene Rohpolysaccharide und weiter aufgereinigte Fraktionen, deren TNF-Aktivität von (-) bis (+++) reichte, mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie auf ihren Gehalt an Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium überprüft und die jeweils enthaltene Menge an Phosphat quantitativ bestimmt.

Tabelle 50: Bestimmung des Ionengehaltes durch Atom-Absorptions-Spektroskopie

Fraktion	TNF-Akt.	Ca ²⁺	Gehalt in ppm			Na ⁺	PO ₄ ³⁻	% Kation. ges.	
			Mg ²⁺	K ⁺					
CH 59 RPS	--	1.540	103	350	4.710	6.400	0,67	1,31	
K7 F 300 13d	+++	620	48	1.320	305	3.000	0,23	0,53	
" 17d	+++	1.818	73	6.060	590	7.000	0,85	1,55	
CH 80 I a	(+)	11.030	1.450	1.270	5.430	9.900	1,91	2,90	
" I b	++	1.180	1.620	790	2.130	3.400	0,57	0,91	
" I c	+	1.220	1.580	1.380	2.710	5.600	0,69	1,25	
" I d	+	11.310	1.360	1.750	420	3.300	1,48	1,81	
" I e	+++	10.940	1.340	2.010	710	3.200	1,50	1,82	
CH 80 II	+	1.460	89	231	978	8.800	0,28	1,15	
CH 80 III a	-	780	80	9.900	106	6.600	1,09	1,75	
" III b	+	691	96	5.540	109	5.500	0,64	1,19	
" III c	+	645	90	4.590	148	n. b.	0,55	---	
" III d	+++	1.860	78	1.580	115	3.300	0,36	0,69	
CH 80 IV a	+	185	92	2.315	1.157	1.100	0,37	0,48	

n. b.: nicht bestimmt

Die prozentualen Anteile der ermittelten Kationen lagen zwischen 0,23 % und 1,91 %, wie aus Tabelle 50 ersichtlich. Eine Korrelation zwischen einem bestimmten Ionengehalt und einer entsprechenden TNF-Aktivität ließ sich nicht erkennen.

Entsprechendes gilt für die Werte der einzelnen Ionen. Fraktion K7 F 300 13d zeigte z. B. mit 620 ppm Ca^{2+} eine ähnlich starke TNF-Stimulierung wie Fraktion CH 80 I e mit 10.940 ppm, während CH 80 I d mit 11.310 ppm nur eine geringe TNF-Freisetzung induzierte. Dies trifft für alle anderen untersuchten Ionen ebenfalls zu.

Für die Wirkung scheint auch ein bestimmtes Verhältnis der Ionen zueinander nicht entscheidend zu sein, wie der Vergleich der beiden stark aktiven und in ihrer Ionenzusammensetzung erheblich voneinander abweichenden Fraktionen CH 80 I e und CH 80 III d in Relation zu der schwach wirksamen CH 80 I d belegt. Letztere weist große Ähnlichkeit zu der wesentlich aktiveren CH 80 I e auf. Rückschlüsse auf eine TNF-Stimulierung können daher aus den Gehaltsangaben der von uns untersuchten Ionen nicht abgeleitet werden.

3.5. Diskussion der Struktur-Wirkungs-Studien

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß keine direkte Korrelation zwischen der Zuckerzusammensetzung, dem Gehalt einzelner Zuckerbestandteile, dem Protein- und Uronsäuregehalt, den Bindungsverhältnissen, dem Verzweigungsgrad, dem Gehalt an Alkali- und Erdalkalitionen und der TNF-Aktivität der einzelnen Polysaccharidfraktionen besteht. Daraus muß man den Schluß ziehen, daß offenbar unter dem Begriff der Kettenkonformation zusammengefaßte, übergeordnete Strukturen für eine Wirkungsausprägung entscheidende Bedeutung besitzen. Diese sind bisher für Arabinogalaktane noch niemals untersucht worden.

Computersimulationen gaben theoretische Hinweise, daß neben (1→3)- β -Glucan- und (1→3)- β -Xylanketten auch einzelne derart verknüpfte Galaktanketten offene Helices zu bilden vermögen (REES *et al.* 1971). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte z. B. das Vorliegen von drei, zu einer Tripelhelix verflochtenen und über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten, (1→3)- β -Xylansträngen in festem Zustand bewiesen werden (ATKINS *et al.* 1969). Bei späteren Untersuchungen ließ sich dieser räumliche Aufbau auch bei einigen (1→3)- β -Glucanen wie z. B. Schizophyllan in Lösung erkennen (NORISUYE *et al.* 1980).

Basierend auf Computerberechnungen (MARCHESSAULT *et al.* 1977) scheint daher eine Formierung von Tripelhelices durch (1→3)- β -Galaktanstränge denkbar. Die in C-6 gebundenen Seitenketten würden dann aus der Helix nach außen weisen, so daß sich die verzweigten (1→3)- β -Galaktane mit einem behaarten Seil vergleichen ließen (CLARKE *et al.* 1979).

Ob die Bildung einer derartigen Struktur auch der TNF-Aktivität des Polysaccharides AG zugrundeliegt bzw. unter welchen Voraussetzungen sie entsteht oder nicht zustandekommt, müssen zukünftige Untersuchungen ergeben.

4. Prüfung der Rohpolysaccharidgemische auf ihre Komponentenzusammensetzung mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Zusammensetzung von Gemischen aus niedermolekularen Verbindungen läßt sich heute durch einfache GC- oder HPLC-Analysen ermitteln. Diese Methoden eignen sich hervorragend, die gleichbleibende Zusammensetzung solcher Mehrkomponentenlösungen zu gewährleisten bzw. zu kontrollieren.

Bei Polymergemischen ist dies nicht mehr auf einfache Weise möglich. Sie weisen häufig einen hohen Polydispersitätsgrad auf, so daß ihr Elutionsprofil an Gelfiltrationssäulen zumindest bei eng beieinanderliegenden Molekulargewichtsbereichen wenig Aussagekraft besitzt. Zudem ergeben sie häufig uncharakteristische UV- bzw. wenig aussagekräftige IR-Spektren, so daß deren Online-Aufnahme zu keinen zusätzlichen Erkenntnissen führt. Deshalb sind andere Verfahren zur Charakterisierung von Polysaccharidgemischen erforderlich.

Wir prüften daher, ob nicht die ^{13}C -NMR-Spektroskopie über die Intensitäten der Signale im Bereich der anomeren Kohlenstoffe Informationen über die quantitative Zusammensetzung der Polysaccharidfraktionen aus Arabinogalaktan und Fucogalaktotoxyloglucan liefern könnte.

Aus diesem Grund stellten wir aus stark angereicherten Arabinogalaktan- (CH P 2N) und Fucogalaktotoxyloglucan-Fractionen (CH P N) drei Mischungen im Verhältnis 3 : 1, 1 : 1 und 1 : 3 her und nahmen von diesen, gemeinsam mit den Ausgangsfraktionen, unter identischen Bedingungen ^{13}C -NMR-Spektren auf.

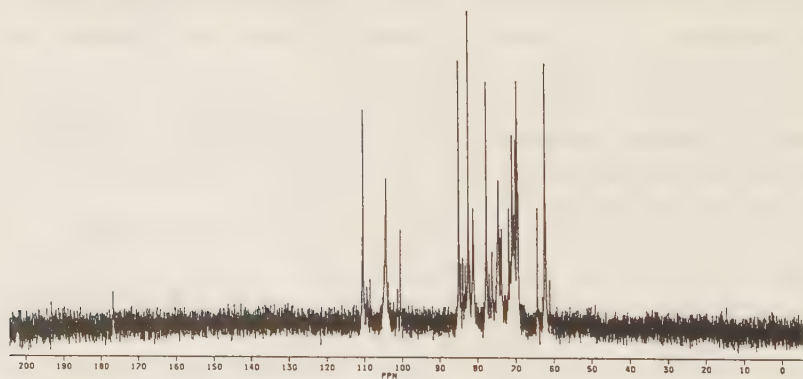


Abb. 55: ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharidfraktion CH P 2N

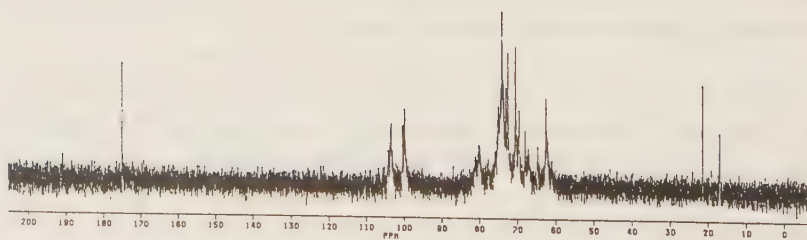


Abb. 56: ^{13}C -NMR-Spektrum der Polysaccharidfraktion CH P N

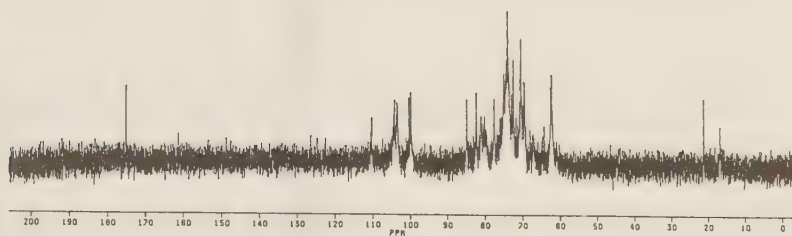


Abb. 57: ^{13}C -NMR-Spektrum des 1 : 3 Gemisches aus CH P 2N und CH P N

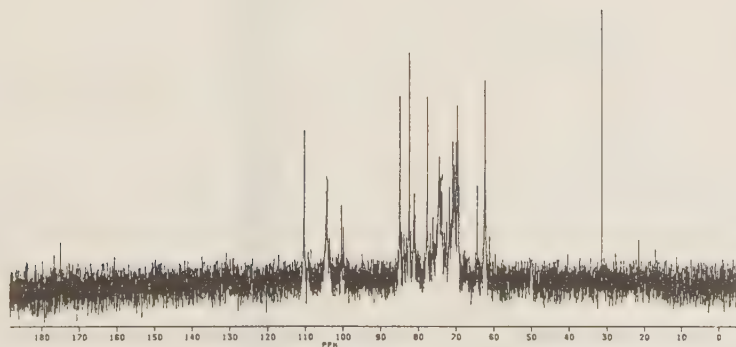


Abb. 58: ^{13}C -NMR-Spektrum des 3 : 1 Gemisches aus CH P 2N und CH P N

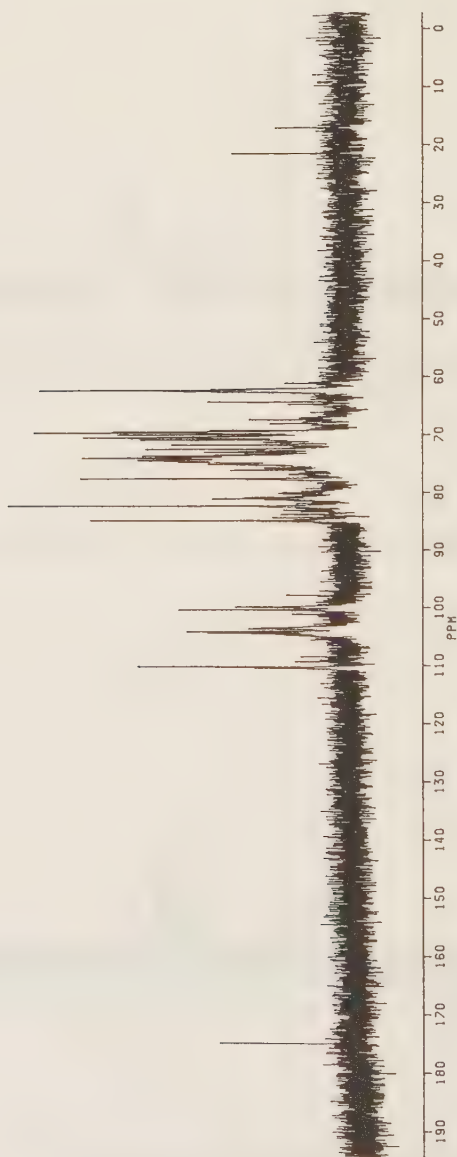


Abb. 59: ^{13}C -NMR-Spektrum des 1 : 1 Gemisches aus CH P 2N und CH P N

Wie aus den Abbildungen 55 – 59 ersichtlich, ließen sich zwar bei den anomeren Kohlenstoffatomen der einzelnen Mischungen unterschiedliche Intensitäten erkennen, diese waren jedoch nicht ausreichend signifikant, um die Menge des enthaltenen Arabinogalaktans auch nur annähernd abschätzen zu können. Dies verdeutlicht ein Vergleich der Spektren der 1 : 1 und 1 : 3 Mischung aus Fucogalaktoxyloglucan und Arabinogalaktan.

Die Gründe für die Erfolglosigkeit dieser Methode liegen in einer Reihe von Fehlermöglichkeiten, die sich auf die Intensitäten der Signale eines ^{13}C -NMR-Spektrums auswirken können :

1. Die abnehmenden Amplituden der Frequenzkomponenten des Impulses mit zunehmendem Abstand zur Senderfrequenz, wodurch Kerne mit unterschiedlicher Resonanzfrequenz nicht gleich stark angeregt werden.
2. Die zu kurze Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen beim Akkumulieren, so daß das Spinsystem nicht durch Relaxation ins Gleichgewicht kommen kann. Dies resultiert in fehlerhaften Integralen, wobei Resonanzsignale von Kernen mit langen Relaxationszeiten T_1 wesentlich stärker als solche mit kürzeren beeinflußt werden.
3. Die Verstärkung der Signale durch den Kern-Overhauser-Effekt (NOE), wie er bei der gleichzeitigen ^1H -Breitband-Entkopplung der ^{13}C -NMR-Spektren zum Tragen kommt und von der Zahl der direkt gebundenen H-Atome und anderen die Relaxationszeiten beeinflussenden Faktoren abhängt (FRIEBOLIN 1988).

Insbesondere die Beseitigung der Fehlermöglichkeit 2 bereitet in der Praxis größere Probleme, da zwischen den Impulsen eine Wartezeit von $5 T_1$ eingeschoben werden müßte, um ein Spinsystem etwa nach einem 90° Impuls wieder nahezu vollständig zu relaxieren. Ein solches Vorgehen würde eine zu große Verlängerung der Meßzeiten bedeuten, so daß Intensitätsmessungen bei ^{13}C -NMR-Spektren praktisch nicht durchgeführt werden können. Eine aussagekräftige, quantitative Erfassung der Einzelkomponenten der Rohpolysaccharidgemische mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie im Rahmen einer Routinebestimmung schied daher aus. Als Alternative bietet sich eine Molekulargewichtsbestimmung der Einzelbestandteile eines Polysaccharidgemisches mittels Low-Angle-Laser-Light-Scattering an, die simultan zu einer Gelfiltrations-

chromatographie des Gemisches erfolgen kann. Diese Methode liefert sehr genaue Werte für M_r und M_n , womit eine gute Charakterisierung auch hochmolekularer Substanzgemische erzielt werden kann.

5. Prüfung auf Kontaminationen mit Lipopolysacchariden

5.1. Kaninchen-Fieber-Test^{*}

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien. Sie rufen bereits in sehr geringen Konzentrationen, 0,1 bis 50 ng je nach Endotoxin, 30 bis 60 Minuten nach intravenöser Applikation einen dosisabhängigen Fieberanstieg hervor, dessen Symptomatik über Schüttelfrost, Leukozytose, Leukopenie, intravasale Gerinnung und Komplementaktivierung bis zu Schock und Tod reichen kann (SCHEER 1984). Endotoxine zählen damit zu den besonders gefährlichen Pyrogenen, so daß das Arzneibuch Parenteralia ab 15 ml Volumen auf mögliche LPS-Kontaminationen mit dem Kaninchen-Fieber-Test prüfen läßt (DAB 9), wobei eine dem Menschen vergleichbare Endotoxinschwellendosis gerade diese Tiere zur Prüfung prädestiniert. Eine Lösung gilt dann als pyrogenfrei, wenn bei einer Injektion von mindestens 0,5 ml und höchstens 10 ml pro kg Körpergewicht die Summe der Temperaturerhöhungen bei drei Kaninchen 1,15° C nicht überschreitet.

Die Ergebnisse der untersuchten Polysaccharide deckten sich völlig mit denjenigen des TNF-Testes. Zwei TNF-negative Fraktionen, NFA 25 (0,96 mg/ml/kg) und SFA 25 4,0 N (0,86 mg/ml/kg) riefen keinen bzw. nur einen geringen Fieberanstieg von 0,5° C hervor, während ein A I und A II enthaltendes Polysaccharidgemisch aus *Arnica montana* Zellkulturen mit guter (++) TNF-Aktivität in einer Konzentration von 0,8 mg/ml/kg einen Fieberanstieg von 6,1° C auslöste.

Dieses Ergebnis läßt jedoch nicht unbedingt auf eine Endotoxin-Kontamination der Arnika-Fraktion schließen. Durch Stimulierung sezernierter TNF- α induziert eine erhöhte Prostaglandin PGE₂-Synthese im Hypothalamus sowie eine Interleukin 1-Freisetzung (DINARELLO *et al.* 1986), die beide eine Fieberreaktion auslösen. Für Substanzen mit TNF-aktivierenden Eigenschaften eignet sich daher der Kaninchen-Fieber-Test nicht zum Nachweis auf Pyrogene.

^{*}Die Kaninchen-Fieber-Tests wurden von Prof. Dr. J. Remien, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München, durchgeführt.

5.2. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-TEST)*

Der Limulustest basiert auf den Koagulierungeigenschaften der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebsses *Limulus polyphemus* in Anwesenheit gramnegativer Bakterien bzw. deren Endotoxinen. Diese aktivieren in Gegenwart zweiwertiger Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} eine dem Blutgerinnungssystem beim Säugetier ähnliche Enzymkaskade, die in den Amöbozyten lokalisiert ist. Sie endet mit der Ausbildung eines Gels durch bestimmte Proteinfractionen, wobei ihr Mechanismus bisher jedoch noch nicht in allen Details geklärt ist (SCHEER 1984).

Als gesichert gilt die Tatsache, daß die Kaskade neben einem endotoxinempfindlichen **Faktor C** auch durch einen auf (1→3)- β -D-Glucanstrukturen ansprechenden **Faktor G** gestartet werden kann (OBAYASHI *et al.* 1986). Beide Wege der Aktivierung münden in dieselbe Stufe der Kaskade ein, so daß von hier aus keine Unterscheidung mehr getroffen werden kann, von welcher Seite die Auslösung erfolgte. Daher führen Untersuchungen an Verbindungen mit entsprechenden Strukturmerkmalen, wie z. B. an Glucanen, oft zu falsch positiven Ergebnissen, die aber auch durch Mannane, Exotoxine, sowie große Mengen grampositiver Mikroorganismen und deren Zellwandbestandteile, die Peptidoglykane, hervorgerufen werden können (SCHEER 1984). Positive LAL-Ergebnisse können daher nicht in jedem Fall mit einer Endotoxinkontamination gleichgesetzt werden. Aus diesem Grund kam zusätzlich ein den Faktor G nicht enthaltendes Lysat** (G-free) zum Einsatz.

Alle drei untersuchten Fraktionen erzielten in diesem Test Ergebnisse, die eine "Endotoxinkontamination" im Nanogrammbereich vermuten ließen, wobei mit dem G-free-Lysat überraschenderweise durchweg höhere Werte als mit dem für routinemäßige Untersuchungen eingesetzten Lysat 99-49-392 aus Cape Cod erhalten werden konnten. Dabei zeigte die Verbindung A II, die auch eine gute TNF-Stimulierung (++) auslöst, den höchsten "Endotoxinwert" mit 14 ng/mg bei Verwendung des G-free-

* Die LAL-Untersuchungen wurden von Frau Dr. R. Urbaschek, Abteilung für Immunologie und Serologie, Institut für Hygiene und Med. Mikrobiologie, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Mannheim, durchgeführt.

** Das Lysat stammte aus dem Labor von Dr. T. Obayashi, Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, Tochigi-ken 329-04, Japan.

Lysates. Ob jedoch der hier beobachtete Unterschied zu dem Gehalt der im TNF-Test völlig inaktiven Fraktion SFA 25 4,0 N, der bei 4 ng lag, für eine so deutliche Sekretion des Monokins ausreicht, darf bezweifelt werden.

Tabelle 51: Endotoxingehalt der Fraktionen A II, NFA 25 und SFA 25 4,0 N im Lysatvergleich zwischen Cape Cod und G-free

	Lysat 99-49-392 aus Cape Cod ng/mg	G-free
A II	2,1	14
NFA 25	0,85	1,1
SFA 25 4,0 N	1,4	4,0

Gesicherte Erkenntnisse, inwieweit Polysaccharide nicht grundsätzlich den LAL-Test beeinflussen, auch wenn sie nicht über (1→3)-β-D-Glucanstruktureinheiten verfügen, sondern, wie bei Polysacchariden aus höheren Pflanzen der Fall, eine sehr komplexe Zusammensetzung aufweisen, fehlen bisher.

5.3. Versuche zur Endotoxinentfernung durch Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose

Zur weiteren Abklärung der Frage einer möglichen Kontamination unserer Polysaccharide mit LPS und dadurch ausgelöste TNF-Stimulierungen, versuchten wir, durch Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose nach der von ISSEKUTZ (1983) beschriebenen Methode, eventuell vorhandenes Endotoxin zu entfernen. Dieses Verfahren nützt die hohe Bindungsaffinität von Polymyxin B zur Lipid A Untereinheit von Lipopolysacchariden aus.

Während des gesamten Vorgangs wurden alle verwendeten Geräte, soweit möglich, zwei Stunden bei 200° C im Trockenschrank einer Hitzesterilisation unterworfen. Alternativ gelangten nur steril verpackte Einmalartikel zum Einsatz. Der Wasserbedarf bei der Pufferherstellung und während der Elution wurde mit pyrogenfreiem Wasser gedeckt.

Zur Überprüfung der Methode setzten wir ein LPS von *Escherichia coli* (Fa. Sigma, Nr. L-4005) in einer Konzentration von 10 µg / ml ein und ließen das Eluat anschließend auf seinen Endotoxingehalt untersuchen. Trotz der hohen Konzentration der Ausgangslösung ergab sich kein Anhaltspunkt auf eine mögliche Kontamination.

Tabelle 52: Endotoxinwerte* der Fraktionen BAT 1, BAT 1Ie DI und BAT 2/IIe DI nach Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose

	G-free	Lysat 99-49-392 aus Cape Cod	
BAT 1	14 ± 6	ng/mg	13 ± 2
BAT 1 nach Chromatographie	21 ± 8		15 ± 3
		Lysat 99-49392 GT	
BAT 1Ie DI			0,23
BAT 1Ie DI nach Chromatographie			0,13
BAT 2/IIe DI			0,20
BAT 2/IIe DI nach Chromatographie			0,22

* Mittelwerte aus Doppelbestimmungen bei drei Verdünnungsstufen

Die drei untersuchten Fraktionen, BAT 1 und zwei weitere, dieser Fraktion vergleichbare Polysaccharide, die aus Laborauftrennungen am Ionenaustauscher von Rohpolysacchariden aus großtechnischer Produktion stammten, lieferten folgende Ergebnisse:

Die Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose führte nur im Fall von BAT 1Ie DI Pol. zu einer Reduzierung des "LPS-Gehaltes". Insgesamt wiesen jedoch die chromatographierten, wie auch die nicht chromatographierten Fraktionen von BAT 1Ie DI und BAT 2/IIe DI mit maximalen LPS-Anteilen von 230 pg/mg nur sehr geringe "Kontaminationen" auf. Alle vier Fraktionen zeigten im TNF-Test keinerlei Wirksamkeit.

Im Gegensatz dazu wurden für die allerdings in einer anderen Testserie mit dem G-free-Lysat untersuchten BAT 1 und BAT 1 Pol. Endotoxinwerte von 14 bzw. 21 ng/mg erhalten. Beide Fraktionen erwiesen sich im TNF-Test auch als schwache (+) TNF-Stimulatoren.

Inwieweit die im Test als LPS-Belastungen angegebenen Werte tatsächlich auf entsprechende Kontaminationen zurückzuführen sind oder ob eine TNF-induzierende Substanz immer auch positive LAL-Testergebnisse erzielt, müssen weitere Untersuchungen ergeben. Fest steht lediglich, daß A II und BAT 1 mit einer gleich starken Endotoxinbelastung von jeweils 14 ng/mg unterschiedliche TNF-Sekretionen auslösten, die A II zu einem guten (++), BAT 1 nur zu einem schwachen (+) Stimulator klassifizieren.

Theoretische Überlegungen schließen jedoch eine allein auf Kontaminationen beruhende TNF-Stimulierung durch unsere Polysaccharide aus. Der bei A II festgestellte LPS-Gehalt von 14 ng / ml bezieht sich auf 1 mg / ml gelöste Substanz. Bei einer Konzentration von 25 µg, in der A II über 2.000 U TNF induziert, enthält demnach der Testansatz $25 \cdot 1,4 \cdot 10^{-9}$ µg LPS oder 0,35 pg. Das im TNF-Test als Positivkontrolle eingesetzte, als besonders guter TNF-Stimulator geltende, Lipopolysaccharid von *Salmonella abortus equi* induziert eine TNF-Sekretion von über 2.000 U bis zu einer Verdünnungsstufe von 0,5 µg / ml und fällt in den nächst tieferen Konzentrationen mit seiner Wirkung allmählich ab. 0,35 pg, etwas weniger als der millionste Teil dieser Menge, können daher unmöglich 2.000 U TNF induzieren. Diese Wirkung muß also zumindest zum größten Teil den Polysacchariden zugeschrieben werden.

Hinzu kommt, daß die Echinacea-Polysaccharide mehrfach in vivo in verschiedenen Dosierungen (1 - 5 mg / Tier) i.p. verabreicht wurden, ohne daß dabei die für LPS üblichen Schock-Reaktionen bzw. Todesfolgen beobachtet worden waren. Die für verschiedene Fraktionen ermittelte LD 50 bei i. p. Injektion liegt bei ≥ 5.000 mg/kg (LENK 1989).

F. PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

1. Einleitung

Aufgrund der Ergebnisse eines Polysaccharidscreenings (WAGNER *et al.* 1985) interessierte bei den isolierten Verbindungen primär ihr Einfluß auf unspezifische, zelluläre Abwehrreaktionen des Immunsystems, wobei hier den neutrophilen **Granulozyten** und dem **mononukleophagozytären System** zentrale Bedeutung zufällt. Anschließend führten wir auch Testungen mit dem zum humoralen Bereich zählenden **Komplementsystem** durch.

Die möglichen Beeinflussungen der ebenfalls an der unspezifischen Immunabwehr beteiligten **T-Lymphozyten** bildeten den Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Hinweisen aus der Erfahrungsmedizin und früheren Untersuchungen folgend, prüften wir die Polysaccharide außerdem auf antiphlogistische Eigenschaften.

Im Verlauf unserer Untersuchungen zeigte sich, daß Polysaccharide bestimmter Struktur Makrophagen zur Freisetzung des Monokins Tumor-Nekrose-Faktor zu stimulieren vermögen. Deshalb prüften wir alle wichtigen Polysaccharidfraktionen auf diese Fähigkeit.

Tabelle 53: Verwendete Abkürzungen der Polysaccharide

	Struktur	neutral/sauer	Quelle
AS 1	4-O-Methylglucuronoxylan	s	Achyrocline satureioides
AS 3	Glykanogalakuronan	s	"
AS 4	Glykanogalakuronan	s	"
AS Fr.	hochgereinigte Fraktion	s	"
AH 1	Oligogalakuronan	s	Arnicae montanae herba
AH fr.	hochgereinigte Fraktion	s	"
A I	Fucogalaktoxyloglucan	n	Arnica montana Zellkulturen
A II	Arabino-3,6-galaktan-Protein	s	"
BAT 1	Arabino-3,6-galaktan-Protein	s	Echinacea pur. Zellkulturen

2. Beeinflussung der Phagozytose

2.1. Chemolumineszenz-Test (mod. nach ALLEN 1981)

Zur Aufnahme von Partikeln durch lebende Zellen stehen im Körper neben mononukleären Phagozyten besonders polymorphkernige, neutrophile Granulozyten zur Verfügung. Die Abtötung der Fremdkörper erfolgt nach Adhärenz und anschließender Ingestion in den gebildeten Phagosomen mittels lysosomaler Enzyme, Säuren und hochaktiver Sauerstoffspezies (VORLAENDER 1983).

Wir bedienten uns zur Bestimmung der Freisetzungsrates dieser Sauerstoffradikale der Chemilumineszenz, die bei der Reaktion dieser Radikale mit Substanzen wie Luminol auftritt. Die Quantifizierung erfolgte über Photonenanzählung im Biolumat. Sie lieferte in Relation zur Positivkontrolle Zymosan ein Maß für die Aktivierung der Zellen durch die betreffende Substanz.

Tabelle 54: Beeinflussung der Chemilumineszenz von Humangranulozyten

Substanz	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	mg/ml
AS 3	14,4 %	18,0 %	10,3 %	--- %	--- %	
AS 4	18,3 %	32,7 %	23,7 %	--- %	--- %	
A I	--- %	--- %	--- %	10,6 %	7,2 %	
A II	24,0 %	7,6 %	5,4 %	--- %	--- %	
BAT 1	--- %	6,0 %	26,7 %	21,1 %	--- %	

Von den fünf untersuchten Polysacchariden zeigte AS 4 aus *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. in einer Konzentration von 10^{-2} mg / ml mit 32,7 % die stärkste Erhöhung der Chemilumineszenz, während AS 3 in derselben Konzentration mit 18,3 % erheblich geringere Aktivität entfaltete.

Die beiden Arabino-3,6-galaktan-Proteine verhielten sich sehr unterschiedlich. Während A II aus *Arnica montana* L. nur in der Konzentration von 100 µg / ml mit 24 % einen deutlichen Einfluß erkennen ließ, entwickelte BAT 1 aus *Echinacea*

purpurea (L.) Moench ähnlich stark stimulierende Eigenschaften bereits bei hundertfach geringerer Konzentration. Das Fucogalaktoxyloglucan A I stimulierte die Radikalfreisetzung kaum.

2.2. Granulozytentest (mod. nach BRANDT 1967)

Die phagozytosesteigernde Potenz einer Substanz läßt sich sehr anschaulich im Granulozytentest prüfen. Hier erfolgt die Bestimmung der Phagozytoseleistung von stimulierten, humanen Granulozyten im Vergleich zur Kontrolle unter Verwendung von Hefezellen als Fremdkörpern. Nach Abstoppen der Reaktion und Anfärben der ingestierten Hefepartikel werden bei ca. 200 bis 300 Granulozyten unter dem Mikroskop die von ihnen phagozytierten Hefen ausgezählt und der Phagozytoseindex als durchschnittliche Zahl phagozytierter Hefezellen pro Granulozyt ermittelt. Die Auswertung erfolgt graphisch.

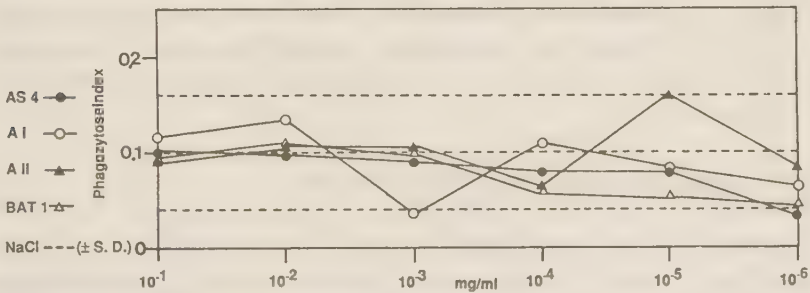


Abb. 60: Phagozytosestimulierungen der Polysaccharide A I, A II, BAT 1 und AS 4 in vitro

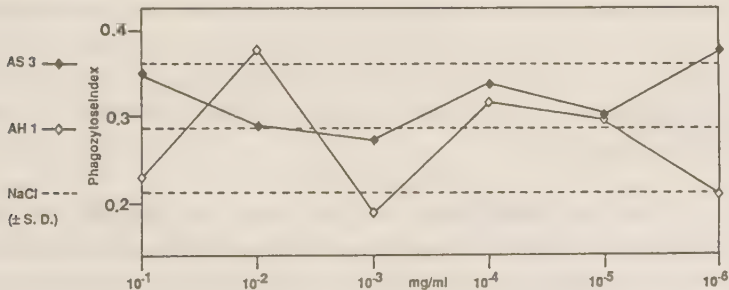


Abb. 61: Phagozytosestimulierungen der Polysaccharide AS 3 und AH 1 in vitro

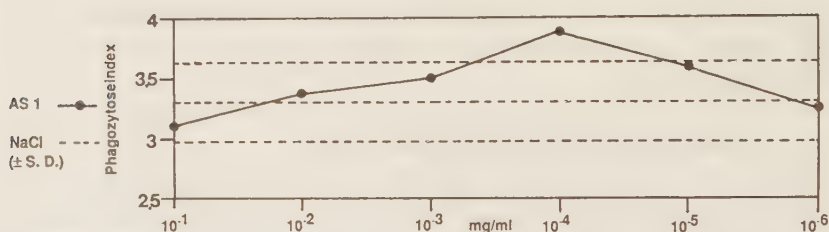


Abb. 62: Phagozytosestimulierung des Polysaccharides AS 1 in vitro

Keine der sechs untersuchten Verbindungen, auch nicht das neutrale Fucogalaktosylglucan A I aus *Arnica montana* L., war in der Lage, Granulozyten signifikant über den Bereich der Standardabweichung der Kontrollen hinaus zur Phagozytose von Hefezellen zu stimulieren bzw. suppressive Einflüsse auszuüben. Die im Chemilumineszenz-Test angedeuteten aktivierenden Eigenschaften einiger Polysaccharide fanden ihre Ursache also nicht in einer direkten Phagozytosestimulierung der Granulozyten.

2.3. Carbon-Clearance-Test (BIOZZI et al. 1953)

Dieser Test stellt ein in-vivo-Modell dar, mit dem die Fähigkeit des mononukleärphagozytären Systems gemessen wird, intravenös injizierte, gelatinestabilisierte Kohlepartikel aus dem Blut zu entfernen. Die über eine bestimmte Zeitdauer spektrophotometrisch beobachtete Abnahme läßt sich mit der aus den Extinktionswerten E ermittelten linearen Regression ($\lg E / t$) mit dem Regressionkoeffizienten RC als Steigung der Geraden darstellen. Der Quotient der Regressionkoeffizienten aus Substanzgruppe und unbehandeltem Mäusekollektiv erlaubt Rückschlüsse über die phagozytosesteigernden Eigenschaften der Substanz, wobei Quotienten über 1,5 eine gute Wirkung dokumentieren.

AS 4 stimulierte die Kohleelimination am deutlichsten und erreichte als einziges Polysaccharid einen Wert über 2, gefolgt vom neutralen Fucogalaktosylglucan A I mit einem Quotienten von 1,9. BAT 1 konnten mit 1,4 nur noch schwache, phagozytosestimulierende Eigenschaften zugeschrieben werden, während die anderen zwei Substanzen im Bereich von 1,7 und 1,8 annähernd gleich gute Wirkungen entfalteten.

Tabelle 55: Ergebnisse der Polysaccharide im Carbon-Clearance-Test

Substanz	RC_v	RC_c	RC_v/RC_c
AS 3	$0,044 \pm 0,008$	$0,024 \pm 0,006$	1,8
AS 4	$0,052 \pm 0,013$	$0,024 \pm 0,006$	2,2
A I	$0,046 \pm 0,003$	$0,024 \pm 0,006$	1,9
A II	$0,058 \pm 0,005$	$0,035 \pm 0,007$	1,7
BAT 1	$0,049 \pm 0,007$	$0,035 \pm 0,007$	1,4

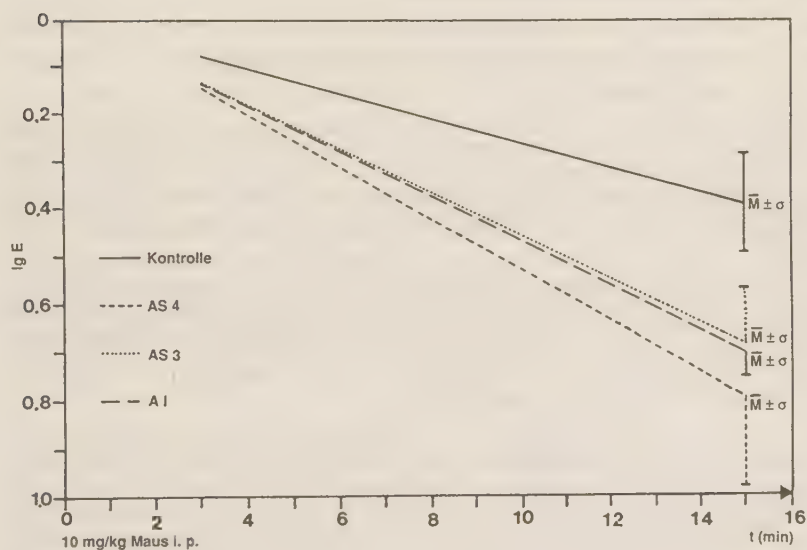


Abb. 63: Phagozytosestimulierung der Polysaccharide A I, AS 3 und AS 4 in vivo

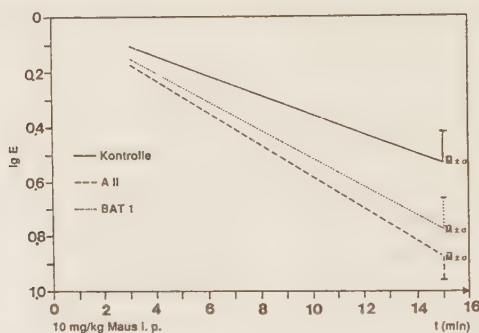


Abb. 64: Phagozytosestimulierung der Polysaccharide A II und BAT 1 in vivo

3. Beeinflussung des Komplementsystems

3.1. Antikomplementäre Aktivität Im Gesamtkomplementtest

Zu den Faktoren des humoralen, unspezifischen Immunsystems zählt neben verschiedenen Enzymen und Transmittersubstanzen das Komplementsystem. Durch seine enge Verknüpfung mit anderen humoralen und zellulären Systemen des Körpers bildet es eine zentrale Schaltstelle innerhalb der körpereigenen Abwehrmechanismen, die z. B. in der hohen Zahl von Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen zum Ausdruck kommt.

Unter dem Begriff Komplement werden ca. 20 verschiedene Proteine und Glykoproteine des Serums zusammengefaßt, deren Hauptsyntheseort die Leber darstellt. Die Aktivierung einzelner Faktoren zieht meist eine Abspaltung von Polypeptidketten nach sich, wobei zumeist das größere Fragment zur Teilnahme an weiteren Reaktionen bereit steht, während das kleinere biologische Funktionen im umgebenden Medium ausüben kann, bevor es inaktiviert wird.

Eine Aktivierung des menschlichen Komplementsystems findet entweder über den **Klassischen** oder den **Alternativen Weg** statt. Beide laufen ab der zentralen Komponente C3 parallel zueinander. Ausgangspunkt für eine Aktivierung des Faktors C1 des Klassischen Weges bildet häufig eine Antigen-Antikörperreaktion, während eine Aktivierung des Alternativen Weges für eine Vielzahl von Substanzen bekannt ist, die z. B. Bakterien, LPS, Zymosan, Polysaccharide wie Inulin und Agarose und Polyanionen einschließt (PANGBURN 1983). Endpunkt aller Reaktionen der Komplementkaskade ab der oberflächengebundenen Komponente C5b bildet eine osmotische Zellyse.

Als Standardmodell für das Screening der Einflüsse von Substanzen auf das Gesamtkomplementsystem eignet sich daher besonders die spektrophotometrisch meßbare Lyse von Erythrozyten, wie sie von KABAT und MAYER (1961) für den Klassischen Weg verwendet wurde. Die Übertragung dieses Modells auf den Alternativen Weg publizierten PLATTS-MILLS und Mitarbeiter (1974).

Die nachfolgend beschriebenen Testverfahren und die hiermit erzielten Ergebnisse basieren auf Modifikationen oben erwähnter Modelle, die von KNAUS (1989) erarbeitet wurden.

Den Testungen in den Testsystemen CP 2 (Klassischer Weg) und AP 2 (Alternativer Weg) ging eine Vorinkubation der Polysaccharide mit konzentriertem Serum voraus, an die sich eine spätere Verdünnung auf die optimalen Testparameter anschloß. Die während der Vorinkubation nicht verbrauchte Menge an Komplement wurde dabei mit einer Indikatorhämolyse ermittelt, die somit ein Maß für die Komplementaktivität der Substanz darstellte.

CP 2 und AP 2 unterscheiden sich in der Art der Zielzellen, die im ersten Fall sensibilisierte Hammelerythrozyten bilden, während im zweiten Fall Kaninchenerythrozyten zum Einsatz gelangen, die auch die Aktivierungsfunktion ausüben. Eine gleichzeitige Reaktion über den Klassischen Weg wurde in AP 2 durch Zugabe eines chelatbildenden Mg^{2+} -EGTA Puffers ausgeschaltet. Dieser weist eine sehr hohe Calcium-Bindungskonstante auf und blockt durch völlige Entfernung dieser Ionen die Entstehung des trimeren C1-Komplexes ab.

Die Berechnung der prozentualen Beeinflussung der Komplementreaktion erfolgt nach spektrophotometrischer Auswertung, wobei ein durch unbeeinflusste Reaktion des Testansatzes ermittelter Kontrollwert als Bezug dient und neben der Zytotoxizität der Substanzen ($NK_{Subst.}$), die Eigenfärbungen der Substanzlösungen und der Serumverdünnungen ($E-Wert_{Subst.}$, $E-Wert_{NHS}$) Korrekturgrößen bilden.

$$Ext_{Subst.} = Ext_{Subst. \text{ gem.}} - (NK_{Subst.} + E-Wert_{Subst.} + E-Wert_{NHS})$$

Die Aktivität einer Substanz drückt sich in der prozentualen Reduktion der Hämolyse aus:

$$\% \text{ Reduktion der Hämolyse} = 100 - \frac{Ext_{Subst.}}{Ext_{PK-Wert}} \cdot 100$$

Tabelle 56: Antikomplementäre Aktivität der Polysaccharide im Klassischen und Alternativen Weg (CP 2, AP 2)

Polysaccharid	Konz. (µg/ml)	Reduktion der Hämolyse in %*	
		Klassischer Weg	Alternativer Weg
AS 3	1000	91,9 ± 0,5	70,2 ± 3,3
	100	35,4 ± 12,2	52,3 ± 6,2
	10	31,2 ± 13,5	22,5 ± 5,9
AS 4	1000	97,1 ± 0,5	87,3 ± 0,5
	100	93,1 ± 0,4	69,6 ± 18,2
	10	38,1 ± 9,6	24,3 ± 5,5
AH Fr.	1000	90,7 ± 0,8	67,3 ± 7,2
	100	38,8 ± 12,9	n. t.
	10	n. t.	n. t.
AH 1	1000	---	63,7 ± 14,8
	100	---	15,1 ± 13,3
	10	n. t.	---
A I	1000	55,5 ± 4,6	27,1 ± 0,5
	100	41,6 ± 4,2	---
	10	n. t.	n. t.
A II	1000	7,7 ± 6,7	98,3 ± 0,5
	100	n. t.	92,7 ± 7,1
	10	n. t.	35,1 ± 5,3
BAT 1	1000	26,2 ± 4,7	---
	100	n. t.	n. t.
	10	n. t.	n. t.

* Mittelwerte aus 3 - 6 Messungen ± Standardabweichung

--- : Hemmung < 5 %

n. t.: nicht getestet

Sehr starke, antikomplementäre Wirkung auf beide Komplementwege übte das Polysaccharid AS 4 aus. Daneben erzielte AS 3, unabhängig von seinem niedrigeren Molekulargewicht, ebenfalls gute Ergebnisse. Das aus der angereicherten *Arnicae*

herba Fraktion AH Fr. isolierte Oligogalakturonan zeigte nur in AP 2 eine Reduktion der Hämolyse. Es ist offensichtlich nicht für die gute Aktivität der Fraktion AH Fr. in CP 2 verantwortlich, obwohl es den Hauptanteil dieser Fraktion bildete. Das Arabino-3,6-galaktan-Protein A II zeigte nur in AP 2 starke antikomplementäre Aktivität, während das ebenfalls aus den Zellkulturen isolierte neutrale Fucogalaktosyloglucan geringere Aktivität, diese jedoch vorwiegend in CP 2 entwickelte. BAT 1 erwies sich als beinahe völlig unwirksam. Da alle Polysaccharide keine Wirkung bei verdünntem Serum (CP 1, AP 1) oder bei Testungen ohne Vorinkubation zeigten, scheinen sie als Aktivatoren der Systeme zu fungieren.

Über die Isolierung antikomplementärer Polysaccharide aus Pflanzen wurde in jüngster Zeit mehrfach berichtet. Unter diesen fanden sich in der Gruppe der neutralen Polymere Homopolysaccharide, wie sie z. B. in den Arabinanen und Glucanen von *Bupleurum falcatum* (YAMADA *et al.* 1988) oder den Glucanen *Lentinan* (SASAKI *et al.* 1976) und *Pachymaran* (SAITO *et al.* 1968) vorliegen. Über antikomplementäre Aktivitäten bei neutralen Heteropolysacchariden mit A I vergleichbarer Struktur existieren bisher keine Literaturangaben.

Die bisher untersuchten aktiven sauren Verbindungen stellen fast ausnahmslos Vertreter der Arabino-3,6-galaktane mit unterschiedlichem Uronsäure- und Proteingehalt dar (GAO *et al.* 1989, WAGNER *et al.* 1988c, KIYOHARA *et al.* 1988, YAMADA *et al.* 1987). Dabei scheint ein höherer Gehalt an Carboxylgruppen für eine antikomplementäre Reaktion über den klassischen Weg von Bedeutung zu sein, während unterschiedliche Molekulargewichte offenbar wenig Einfluß ausüben (YAMADA *et al.* 1986). Vertreter der stark sauren Schleimpolysaccharide erwiesen sich allerdings als nur schwach aktiv oder völlig unwirksam (YAMADA *et al.* 1985).

Bei den von uns untersuchten sauren Polysacchariden zeigte A II mit seinem im Vergleich zu AS 3 und AS 4 geringen Uronsäuregehalt ausschließlich im alternativen Weg deutliche antikomplementäre Aktivität, während AS 3 und AS 4 in beiden Testsystemen eine hohe Hämolysereduktion auslösten. Diese erreichte jedoch trotz des unterschiedlichen Molekulargewichtes beider Polymere ein sehr ähnliches Ausmaß.

Mit AS 3 und AS 4 erwiesen sich erstmals auch Vertreter aus der Klasse der Glykanogalakturonane als stark antikomplementär wirksam.

3.2. Nachweis der Aktivierung der Komponente C3 und des Faktors B durch Immundefixation

Die Immundefixation gilt als sensitivste immunochemische Detektionsmöglichkeit der Komplementaktivierung (SUN *et al.* 1986). Dabei erfolgt nach der Inkubation der Testsubstanz mit menschlichem Serum eine Elektrophorese in Agarosegel, bei der C3-Spaltprodukte und das Fragment Ba der Faktor B-Aktivierung in Richtung der Anode wandern, während sich das Fragment Bb zur Kathode bewegt. Nach anschließender Immundefixation mit Antiserum erfolgt das Anfärben nicht ausgewaschener Antigen-Antikörperkomplexe mit Coomassie Blau. Eine Laser Densitometermessung ermöglicht daraufhin die quantitative Erfassung der Reaktion (BECKER 1980, MAUFF 1988).

Die gemessenen Intensitäten der angefärbten Banden werden bei der Auswertung als Peakflächen dargestellt und das Verhältnis des konvertierten Anteiles der Komponente zur Gesamtfläche berechnet. Eine durch die Inkubationsbedingungen ausgelöste Eigenaktivierung der Komponente C3 und des Faktors B wird in den Berechnungen berücksichtigt.

$$\text{Abs. Aktivierung (\%)} = \% \text{ konvert. Anteil}_{\text{Subst.}} - \% \text{ konvert. Anteil}_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Rel. Aktivierung (\%)} = \frac{\% \text{ konvert. Anteil}_{\text{Subst.}}}{(100 \% - \% \text{ konvert. Anteil}_{\text{Kontrolle}})} \cdot 100$$

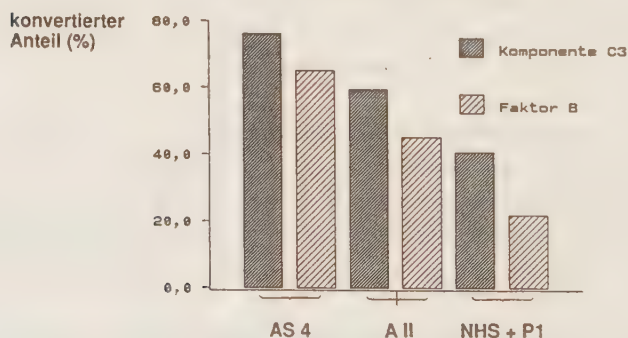


Abb. 65: Aktivierende Einflüsse der Polysaccharide AS 4 und A II auf die Komponente C3 und den Faktor B

Beide untersuchten Polysaccharide AS 4 und A II beeinflussten die Komponente C3 und den Faktor B, wobei AS 4 einen höheren Anstieg an Spaltprodukten verursachte. Dies beweist eine Aktivierung des Alternativen Weges.

4. Stimulierung der Lymphozytenproliferation

Lymphozyten erfüllen bei der Immunantwort unterschiedliche Funktionen. B-Lymphozyten sezernieren Antikörper nach Bindung an ein Antigen, während T-Lymphozyten unter anderem im Rahmen der zellulären Immunität durch Sekretion von Mediatorsubstanzen zelluläre Effektorreaktionen induzieren oder, nach Differenzierung zu ihren sensibilisierten Formen, andere Zellen abtöten.

Uns interessierte, ob die isolierten Polysaccharide auch die Lymphozytenproliferation beeinflussen können und verwendeten dazu ein Testsystem nach DUTTON und EADY (1964) in einer Modifikation nach KREHER (1989). Auswirkungen auf die Lymphozytenproliferation lassen sich durch den Einbau ^3H -markierten Thymidins messen. Die Ermittlung der Lymphozytenaktivität erfolgte auch nach gleichzeitiger Costimulierung der Zellen mit den Lektinen Concanavalin A und Phytohämagglutinin.

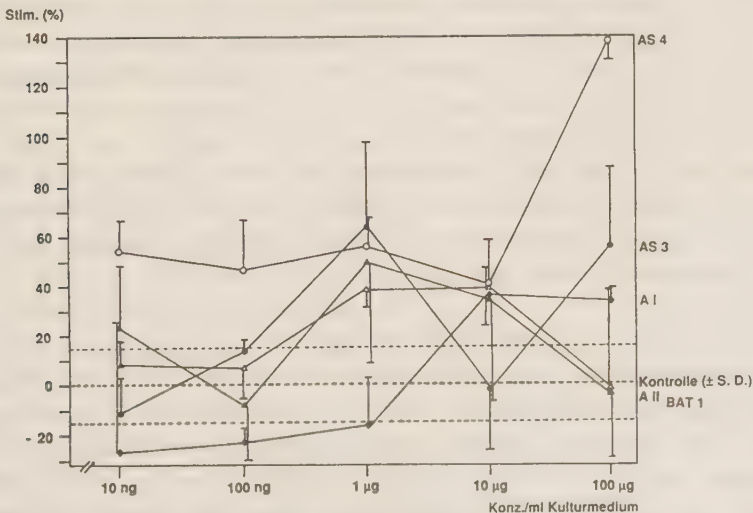


Abb. 66:

Einflüsse der Polysaccharide A I, A II, AS 3, AS 4 und BAT 1 auf die Lymphozytenproliferation

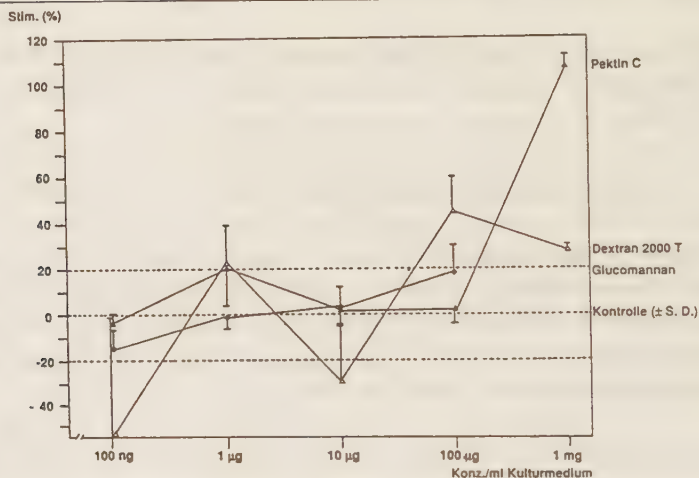


Abb. 67: Einflüsse von Pektin C, Dextran 2000 T und Glucomannan auf die Lymphozytenproliferation

Von den untersuchten Polysacchariden zeigte AS 4 die beste Aktivität, indem es bei 100 µg/ml knapp 140 % stimulierte. Die Wirkung verringerte sich zwar mit abnehmender Konzentration, fiel jedoch bei keiner Konzentration in den Bereich der Kontrollwerte ab. AS 3 zeigte nur in den Konzentration 1 und 100 µg/ml mitogene Eigenschaften, allerdings im Vergleich zu AS 4 in deutlich geringerem Maße. Die beiden Arabino-3,6-galaktan-Proteine A II und BAT 1 verhielten sich relativ ähnlich. Sie stimulierten beide jeweils nur in einem Bereich zwischen 1 bis 10 µg / ml in einer Höhe von etwa 40 %, wobei die Werte von BAT 1 allerdings starke Schwankungen aufwiesen. Das neutrale A I zeigte nur in den beiden höchsten Konzentrationen schwach stimulierende Effekte, ließ in niedrigerer Dosierung aber eher suppressive Einflüsse erkennen.

Costimulierungen mit Lektinen führten bei keinem Polysaccharid zu einer Wirkungssteigerung. AS 4 zeigte nach Vorinkubation mit Phytohämagglutinin bei 100 µg / ml noch eine Stimulierung von etwa 60 %, die in den niedrigeren Konzentrationen jedoch die Kontrollwerte erreichte. Die Costimulierung mit Concanavalin A lieferte bessere Ergebnisse, wobei wir hier mit ca. 80 % bei 100 ng / ml die maximale Wirkung in einem wesentlich tieferen Konzentrationsbereich fanden. Die Aktivitäten der anderen Verbindungen mit vorstimulierten Zellen lagen in Größenordnungen zwischen 15 und 30 %.

Zu Vergleichszwecken testeten wir zwei neutrale Polysaccharide, Dextran 2.000 T (Fa. Roth) und ein Glucomannan (Fa. Serva) $M_w 2 \cdot 10^6$ D aus *Xanthomonas campestris* sowie ein Citruspektin (Fa. Roth) mit einem Veresterungsgrad von ca. 70 %.

Das Glucomannan zeigte nur mit Concanavalin A costimulierten Zellen oberhalb von $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ mitogene Eigenschaften, während Dextran 2.000 T in demselben Konzentrationsbereich nach Vorinkubation mit Phytohämagglutinin eine schwache, stimulierende Wirkung erkennen ließ, die bei nicht vorbehandelten Zellen nur noch oberhalb von $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ beobachtet werden konnte. Das Pektin stimulierte deutlich in einer Konzentration von $1 \text{ mg} / \text{ml}$ mit über 100 %, fiel in den niedrigeren Verdünnungsstufen jedoch sofort in den Bereich der Kontrollwerte zurück. Die nach Costimulierung gemessenen Thymidineinbauraten ließen keine deutlich ausgeprägte Wirkung erkennen.

Eine stimulierende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation scheint nach unseren Ergebnissen von bestimmten strukturellen Voraussetzungen abzuhängen, wie das ähnliche Verhalten der Arabino-3,6-galaktan-Proteine und der Vergleich der Citruspektin-Wirkung mit AS 4 vermuten lassen. Ein Kriterium bilden offenbar größere Anteile saurer Gruppen im Molekül. Auch für andere Polyanionen wie die sulfatierten Polysaccharide Carrageenan, Dextransulfat und Heparin konnte bereits eine mitogene Wirkung nachgewiesen werden (PALACIOS *et al.* 1982, SUGAWARA *et al.* 1982, ISHIZAKA *et al.* 1980).

Da jedoch auch neutrale Polysaccharide aktivierende Einflüsse besitzen, wie kürzlich KNAUS (1989) bei einem aus der Muschel *Perna canaliculus* isolierten, stark verzweigten Glykogen festgestellt hatte, im Gegensatz dazu das lineare Dextran 2.000 T jedoch kaum stimulierende Eigenschaften zeigte, dürfte der Verzweigungsgrad des Polymers für die Wirkung von Bedeutung sein.

Außerdem scheint das Molekulargewicht einer Verbindung für ihre lymphozytenproliferationsfördernde Aktivität eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies lassen die deutlich unterschiedlichen Stimulierungsraten von AS 3 und dem im Molekulargewicht doppelt so großen AS 4 vermuten. Vergleichbare Ergebnisse lieferten vier, nur aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichtes differenzierte, ansonsten aber nicht näher charakterisierte Rohpolysaccharidfraktionen aus *Thuja occidentalis* (GOHLA *et al.* 1988).

5. Hemmung des Rattenpfotenödems

Die antiphlogistische Aktivität von Polysacchariden in Tiermodellen ist seit längerem bekannt (ROCHE SILVA *et al.* 1969). Zur Klärung der Frage, ob auch die von uns isolierten Verbindungen entzündungshemmende Einflüsse besitzen, setzten wir als Testmodell das carrageenaninduzierte Rattenpfotenödem ein. Von uns unabhängig hatten SIMOES und Mitarbeiter (1988) für Wasserextrakte aus *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. bereits antiphlogistische Eigenschaften festgestellt. Für diese Wirkung machten sie jedoch die in den Extrakten nachgewiesenen Flavonoide verantwortlich.

Die getesteten Substanzen wurden intravenös eine Stunde vor der Carrageenanprovokation appliziert und in ihrer Wirkung anschließend mit dem bekannten Antiphlogistikum Indometacin verglichen. Aufgrund des hohen Substanzbedarfes testeten wir nicht das reine Polysaccharid AH 1, sondern die hochgereinigte Fraktion AH Fr..

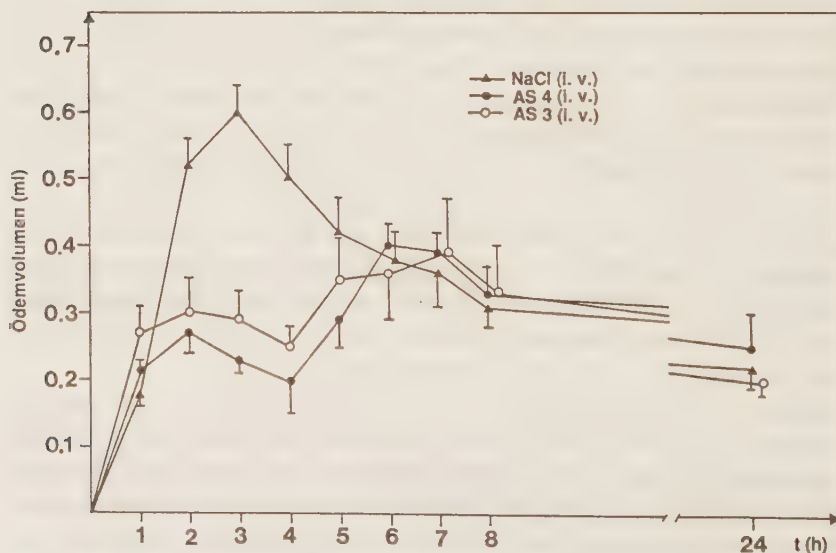


Abb. 68:

Antiphlogistische Aktivität der Polysaccharide AS 3 und AS 4 im carrageenaninduzierten Rattenpfotenödem

Tabelle 57: Antiphlogistische Wirkungen der Polysaccharide im Rattenpfoten-
ödemtest

Polysaccharid		Konz. mg/kg	Reduktion in %* (Zeitraum 8 Stunden)	Reduktion in %* (Zeitraum 24 Stunden)
AS Fr.	i.v.	10	46,1	23,8
		3	52,4	59,4
		1	39,3	---
AS Fr.	i.p.	10	6,4	-15,4
		3	-0,5	---
		1	13,2	---
AS 3	i.v.	3	23,5	9,5
AS 4	i.v.	3	33,1	6,7
AH Fr.	i.v.	3	24,0	13,1
A II	i.v.	3	-0,8	4,4
BAT 1	i.v.	3	22,7	28,9
Chargenpool	i.v.	3	-0,5	0,3
BAT N 1	i.v.	3	18,3	10,3
EN 1	i.v.	3	37,1	33,7
Indometacin	i.v.	10	22,9	9,0

* Mittelwerte aus 6 - 8 Tieren

p < 0,05

Von den in einer Konzentration von 3 mg / ml eingesetzten Polysacchariden zeigte die aus *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. gewonnene, AS 3 und AS 4 enthaltende Fraktion AS Fr. mit 52,4 % nach acht Stunden die stärkste Reduktion des Rattenpfotenödems. Sie lag etwa um das zweieinhalbfache über derjenigen von Indometacin, wobei dieses jedoch in einer Konzentration von 10 mg / ml verabreicht wurde. Eine Erhöhung der Dosis von AS Fr. auf 10 mg / ml führte zu keiner Wirkungssteigerung, während eine Verringerung auf 1 mg / ml noch immer eine Reduktion von

39 % auslöste. Die parallel durchgeführte intraperitoneale Applikation von AS Fr. rief nur bei einer Konzentration von 1 mg / ml eine schwache Wirkung von 13 % hervor.

Die beiden Reinverbindungen AS 3 und AS 4 zeigten dagegen ein etwas abweichendes Verhalten. Beide führten zwar im Zeitraum zwischen der ersten und der fünften Stunde nach Carrageenanprovokation zu einer drastischen Reduktion des Ödemvolumens, die nach vier Stunden ihr Maximum erreichte und 60 % (AS 4) bzw. 50 % (AS 3) betrug; nach sechs Stunden jedoch ließen sich zwischen den Volumina der Substanz- und Kontrollkollektive keine Unterschiede mehr feststellen. Dies führte, bezogen auf eine Meßdauer von 8 Stunden, für die Verbindungen AS 3 und AS 4 zu einer Reduktion des Ödemvolumens von 23,5 bzw. 33 %.

Beide Verbindungen zusammen bilden etwa 50 % der Fraktion AS Fr. Inwieweit Polysaccharide aus den restlichen 50 % ebenfalls antiphlogistische Einflüsse ausüben und so für die zusätzliche Aktivität von AS Fr. verantwortlich zeichnen, oder ob AS 3 und AS 4 gemeinsam, durch synergistische oder additive Effekte, die noch höhere Wirksamkeit von AS Fr. bedingen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Die beiden Glykanogalakturen AS 3 und AS 4 in der Fraktion AS Fr. können demnach neben den Flavonoiden als zusätzliche, antiphlogistische Wirkprinzipien der Wasserextrakte von *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. betrachtet werden.

Mit Indometacin vergleichbare Einflüsse übten BAT 1 und die AH 1 enthaltende Fraktion AH Fr. aus *Arnica montana* L. aus, während A II keinerlei Wirkungen zeigte.

Interessanterweise erwies sich das aus großtechnischer Aufarbeitung stammende, neutrale Fucogalaktoxyloglucan BAT N 1 als etwa gleich aktiv, wie das aus demselben Rohpolysaccharidgemisch stammende Arabino-3,6-galaktan-Protein BAT 1. Dieses Rohpolysaccharid, der Chargenpool, zeigte selbst jedoch keine Wirkung. Mit einer Reduktion von 37 % ließ ein Fucogalaktoxyloglucan (EN 4) aus *Echinacea purpurea* Zellkulturen (WAGNER *et al.* 1988b) ebenfalls gute entzündungshemmende Eigenschaften erkennen.

In der Literatur finden sich Hinweise auf antiphlogistische Wirkungen im Rattenpfotenödemtest für Polysaccharide, die Protein enthalten (WAGNER *et al.* 1981b, ARITA *et al.* 1974), für glucuronsäurehaltige Heteropolysaccharide (KIHO *et al.* 1985), Glucane und Mannane (HARA *et al.* 1982, UKAI *et al.* 1983) und neutrale Heteropolysaccharide (KATO *et al.* 1985). Mit den Polysacchariden AS 3 und AS 4 fanden wir entsprechende Wirkungen erstmals auch in der Klasse der Glykanogalakturenane (TUBARO 1989).

Nach DI ROSA und Mitarbeitern (1971) scheint dem Komplement eine entscheidende Triggerfunktion in den ersten sechs Stunden der akuten Phase dieses Entzündungsmodelles zuzufallen. Untersuchungen an dekomplementierten Ratten und einem anderen, granulozytendepletierten Kollektiv zeigten, daß nur Versuchstiere mit einem erniedrigten Komplementspiegel auch ein verringertes Ödemvolumen aufwiesen. Zwischen der sehr guten Aktivität von AS 3 und AS 4 in beiden Komplementtests CP 2 und AP 2 und den hervorragenden Resultaten dieser Polysaccharide im Rattenpfotenödemtest, die ihre maximalen Aktivität in einem Zeitraum von ein bis vier Stunden nach der Carrageenaninjektion entfalteten und nur im komplementabhängigen Bereich der Reaktion überhaupt Aktivität zeigten, ließe sich somit ein direkter Zusammenhang herstellen. Die antiphlogistische Wirkung der Polysaccharide AS 3 und AS 4 könnte somit z. T. auf deren antikomplementäre Eigenschaften zurückgeführt werden.

6. Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF- α)

Die vielfältigen Einflüsse des Monokins TNF- α auf Vorgänge des Entzündungs- und Immungeschehens und seine Rolle bei der Tumorbekämpfung werden zur Zeit in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Ausgangspunkt für diese Forschungsarbeiten bildet das durch den Arzt William B. Coley Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Phänomen, daß es bei Krebspatienten, die gleichzeitig an schweren Infektionen mit gramnegativen Bakterien litten, oftmals zu einer Verringerung des neoplastischen Gewebes kam. Ein von ihm aus abgetöteten Bakterien hergestelltes sogenanntes "Coley's Toxin" fand danach für längere Zeit mit wechselnden Erfolgen Eingang in die Krebstherapie. Später stellte sich ein Lipopolysaccharid als aktives Prinzip der Zubereitung heraus, welches einen Serumfaktor induzierte, der als **Tumor-Nekrose-Faktor** identifiziert werden konnte (CARSWELL *et al.* 1975).

Bei TNF- α handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17.350 D, das häufig in dimerer oder multimerer Form auftritt (BEUTLER *et al.* 1985a). Seine dreidimensionale Struktur weist typische Merkmale von Virusproteinen auf, wie sie bisher noch nie bei nicht-viralen Proteinen gefunden wurden (JONES *et al.* 1989). TNF- α wird von Makrophagen sezerniert und bindet an spezifischen Oberflächenre-

zeptoren zahlreicher Zelllinien (KULL *et al.* 1985). Etwa 30 % seiner Aminosäuresequenz stimmen mit dem Proteinmuster des aus aktivierten Lymphozyten freigesetzten Lymphotoxins oder TNF- β überein.

Umfangreiche Studien lassen in zunehmendem Maße die differenzierten und äußerst komplexen Regulatorfunktionen dieses Monokins im Körper erkennen, wie sie Abbildung 69 skizziert.

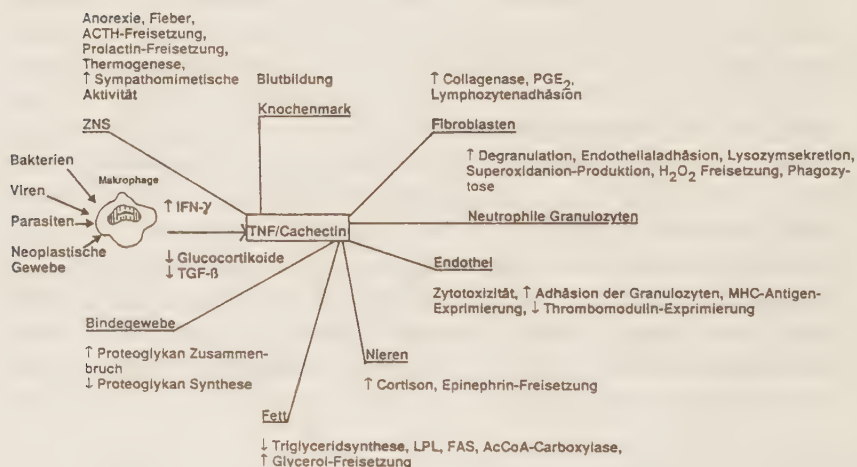


Abb. 69: Wechselwirkungen des TNF- α mit unterschiedlichen Zellen

Der TNF- α spielt bei der **Entzündung**, als **Immunmodulator** und bei der **Regulierung des Tumorzellwachstums** eine wichtige Rolle.

Neutrophile Granulozyten reagieren auf Zugabe von TNF- α mit Sauerstoffradikalfreisetzung, Degranulation und erhöhter Phagozytoseaktivität (SHALABY *et al.* 1985, KLEBANOFF *et al.* 1986). Durch Exprimierung spezieller Oberflächenrezeptoren zeigen sie danach außerdem schneller Bereitschaft, sich an vaskuläre Endothelzellen zu binden. Zudem ruft TNF- α eine Fieberreaktion hervor, die zuerst durch eine erhöhte Prostaglandin PGE_2 Synthese im Hypothalamus, später durch die Induzierung von Interleukin 1 aufrecht erhalten wird (DINARELLO *et al.* 1986).

Im Unterschied zu diesen, auf plötzliche, hohe TNF-Spiegel zurückzuführenden Effekte, ruft eine längerfristige Sezernierung des Monokins im Körper deutlich andere Wirkungen hervor. Diese Erkenntnis beruht auf der Entdeckung der Identität von TNF- α mit Cachectin (BEUTLER *et al.* 1985b). Cachectin fällt eine zentrale Rolle bei der Auslösung verschiedener Erscheinungen zu, die während der Cachexie und des durch schwere Infektionen mit gramnegativen Bakterien verursachten septischen Schocks beobachtet werden können und sich von Gewichtsverlust und Anorexie über Anämie und Lungenödem bis zur hämorrhagischer Nekrose im Pankreas erstrecken.

Als Immunmodulator beeinflusst TNF direkt Wachstum und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten (JELINEK *et al.* 1987, ZUCALI *et al.* 1987). Außerdem greift es indirekt durch Stimulierung der Freisetzung von Interleukin 1 α und 1 β sowie Interleukin 6 in immunologische Vorgänge ein (ONOZAKI *et al.* 1988).

Neben der direkten Antitumoraktivität (KULL *et al.* 1985, AGGARWAL *et al.* 1985) von TNF- α in vitro, die sich allerdings nur auf bestimmte sensible Zelllinien beschränkt, zerstört das Monokin auch Tumore in vivo durch hämorrhagische Nekrose, selbst wenn einige dieser Gewebe im Reagenzglas keine Beeinflussung erkennen lassen (PALLADINO *et al.* 1987). Dieser indirekte Mechanismus findet bisher keine Erklärung. Überraschenderweise ergaben Kombinationen mit Interferon- γ synergistische Effekte, die zur Abtötung solcher Tumorzellen führten, die zuvor keine Sensibilität gegenüber den einzelnen Cytokinen besaßen (WILLIAMSON *et al.* 1983). Im Gegensatz zur Zerstörung maligner Gewebe fördert TNF- α jedoch die Proliferation normaler Fibroblasten (VILCEK *et al.* 1983).

Klinische Studien lieferten bisher nicht die erhofften Tumorregressionen. Zu den unerwünschten Begleiterscheinungen der TNF- α -Therapie zählen mit Fieber, Schüttelfrost, Lethargie und Blutdruckabfall ähnliche Symptome, die auch bei der Anwendung anderer Cytokine auftraten. Ansatz für zukünftige Untersuchungen dürfte die Kombination mehrerer Cytokine oder ihre Applikation gemeinsam mit Cytostatika darstellen (OLD 1988).

Es sollte jedoch nicht vergessen werden, daß zu den vielfältigen Eigenschaften des TNF- α auch seine Funktion als Wachstumsfaktor für normale Fibroblasten sowie T- und B-Zellen zählt, so daß er auch die Vermehrung bestimmter pathologischer Zustände dieser Zelllinien fördert (CORDINGLEY *et al.* 1988), eine Eigenschaft, die beispielsweise in einer Verstärkung der Replikation der HIV-1 Viren in de novo infizierten T4-Zellen Ausdruck findet.

Zur Untersuchung der TNF- α Aktivität kam ein von RUFF und GIFFORD (1981) weiterentwickeltes Testsystem zum Einsatz, bei dem Fibroblasten als Zielzellen dienen. Sie werden nach Aktivierung von Makrophagen durch unterschiedlich konzentrierte Substanziösungen mit deren TNF- α haltigen Überständen inkubiert. Die Substanzverdünnung mit der Aktivität eines Units TNF ist definitionsgemäß in der Lage, gerade 50 % der Fibroblasten abzutöten.

Tabelle 58: Dosisabhängige Freisetzung des TNF- α nach Stimulierung durch die Polysaccharide

Polysaccharid	Units / μg / 10^5 Makrophagen				
	25	12,5	6	3	1,5
AS Fr.	> 2.000	1.024	1.024	1.024	256
AS 3	512	256	32	16	---
AS 4	> 1.000	512	128	32	---
AH Fr.	> 2.000	1.024	256	8	8
AH 1	---	---	---	---	---
A I	---	---	---	---	---
A II	>2.000	1.024	256	16	8
AG _{neu}	512	128	16	---	---
BAT 1	64	32	8	---	---
BAT 1 Aff.	64	32	8	---	---
Chargenpool (10 mg / ml)	128	64	---	---	---
Pectin C	---	---	---	---	---

---: Keine TNF-Stimulierung nachweisbar

Von den untersuchten Fraktionen zeigte die AS Fr. die mit Abstand beste Stimulierung und induzierte noch in einer Konzentration von 1,5 μg / ml 256 U TNF- α . Die aus ihr isolierten Polysaccharide AS 3 und AS 4 erwiesen sich als schwächer aktiv, wobei AS 4 mit einer Freisetzung von 128 U bei 6 μg / ml trotzdem als guter Aktivator eingestuft werden kann. Die AH Fr. ließ ebenfalls gute Stimulierungen erkennen. Das aus ihr gewonnene Oligogalakturonan AH 1 erwies sich in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen hingegen als unwirksam.

Bei den Arabino-3,6-galaktan-Proteinen induzierte A II bis zu einer Konzentration von 6 μg / ml eine sehr starke Freisetzung des TNF- α . Sie nahm in den folgenden Verdünnungsstufen jedoch rasch ab. Die aus verschiedenen Rohpolysacchariden von

Echinacea purpurea Zellkulturen isolierten AG_{neu} und BAT 1 zeigten unterschiedliche Aktivitäten. Während AG_{neu} gute Freisetzungen auslöste, induzierte BAT 1 eine wesentlich geringere TNF- α -Sekretion. Der Chargenpool, aus dem BAT 1 isoliert wurde, stimulierte kaum.

Wie diese Ergebnisse zeigen, gelang es uns nicht, aus einer aktiven Fraktion das Wirkprinzip derart anzureichern, daß die gereinigte Komponente eine gesteigerte Sekretion induzierte. Möglicherweise kommen in den Fraktionen und Rohpolysacchariden additive und synergistische Einflüsse zum Tragen, die während nachfolgender Reinigungsschritte verloren gehen. Eventuelle Kontaminationen mit LPS und darauf zurückzuführende falschpositive Ergebnisse wurden durch Affinitätschromatographie der Verbindungen an Polymyxin B-Agarose ausgeschlossen (ISSEKUTZ 1983). Die Unterschiede in den Wirkungen von behandelten und unbehandelten Polysacchariden konnten vernachlässigt werden.

Da sich das neutrale Polysaccharid A I als unwirksam erwies, muß eine bestimmte Anzahl von sauren Gruppen im Molekül als Voraussetzung für eine Aktivität angesehen werden. Die fehlende Stimulierung durch das Pektin C (Fa. Sigma) läßt jedoch noch eine Reihe anderer essentieller Strukturmerkmale vermuten. Von diesen besitzt das Molekulargewicht zumindest ab einem bestimmten Mindestwert offensichtlich nur eine untergeordnete Bedeutung. Diese Schlußfolgerung ergibt sich aus der ähnlichen Stimulierungsrate von AS 4 mit einem mittleren Molekulargewicht von 15.000 D und A II mit 100.000 D. Die Unwirksamkeit von AH 1 dürfte jedoch gewisse Mindestanforderungen an die Größe des Stimulators beweisen, die dieses Oligosaccharid offenbar unterschreitet. Genauere Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen scheitern an der Tatsache, daß bisher nur für eine äußerst geringe Anzahl von Naturstoffen eine Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors beschrieben wurde. Neben einem sauren Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* Zellkulturen (WAGNER *et al.* 1988b) liegen nur für PSK, ein proteingebundenes Polysaccharid aus *Coriolus versicolor*, Hinweise für eine verstärkten TNF-Produktion in Mäusen vor. Allerdings ging hier eine Behandlung des Versuchskollektives mit *Corynebacterium parvum* und *Escherichia coli* voraus (MORI *et al.* 1987).

7. Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität

Arachidonsäuremetaboliten spielen für den Beginn und den Verlauf von Entzündungen eine wichtige Rolle. Über den Cyclooxygenaseweg entstehen dabei nach instabilen Zwischenprodukten eine Reihe stabilerer Prostaglandine, zu denen auch PGE_2 und PGD_2 zählen. Eine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese wird für eine Reihe synthetischer Substanzen (FENNER 1984) und Naturstoffe (MICHEL *et al.* 1985, BURSTEIN *et al.* 1974) beschrieben, wobei Oligo- oder Polysaccharide bisher nicht als mögliche Inhibitoren galten. Die untersuchten Arabino-3,6-galaktan-Proteine BAT 1 und A II inhibierten in einem Konzentrationsbereich von 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 13,7 % bzw. 15,5 %. Beide Polysaccharide beeinflussten somit die Cyclooxygenase praktisch nicht.

8. Diskussion der pharmakologischen Untersuchungen

Von den untersuchten Polysacchariden lieferte die Verbindung AS 4, bzw. die sie enthaltende Fraktion AS Fr. aus *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., in fast allen Testsystemen die besten Resultate, während das Arabinogalaktan-3,6-Protein A II aus dem Nährmedium von *Arnica montana* L. vorwiegend im TNF-Test gute Stimulierungen zeigte und sich das aus demselben Nährmedium isolierte neutrale A I vorwiegend durch eine sehr gute Stimulierung im Carbon-Clearance-Test auszeichnete.

Die guten Reduktionen des Ödemvolumens durch AS Fr. und die reinen Polysaccharide AS 3 und AS 4 im Rattenpfotenödemtest könnten auf einer Aktivierung des Komplementsystems und dadurch verringerten Komplementspiegeln beruhen, wie es die antikomplementären Wirkungen von AS 3 und AS 4 in den beiden Testsystemen CP 2 und AP 2 sowie die Resultate der Immunfixation vermuten lassen.

Die gefundene T-Lymphozytenstimulierung durch AS 4 könnte über eine Zweitreaktion zustandekommen, da $\text{TNF-}\alpha$ T-Zellproliferationsfördernde Eigenschaften besitzt (YOKOTA *et al.* 1988).

Die Beeinflussung der Chemilumineszenz durch AS 4 und die Arabino-3,6-galaktan-Proteine kann jedoch nicht auf eine TNF-Wirkung zurückgeführt werden. Die mit diesem Testsystem erhaltenen Werte dokumentieren daher sehr wahrscheinlich eine direkte Reaktion der Polysaccharide mit den Granulozyten.

Bei dem als schwacher Aktivator des Alternativen Weges der Komplementkaskade erkannten Oligosaccharid AH 1 könnte das Molekulargewicht für das Stimulierungsverhalten primär verantwortlich sein. Die aktivere AH Fr., aus der es isoliert wurde, enthält entweder noch Anteile höhermolekularer Verbindungen, oder es liegt ein synergistischer bzw. additiver Effekt von AH 1 mit anderen Bestandteilen dieser Fraktion vor.

Insgesamt handelt es sich bei den Polysacchariden AS 4 und AS Fr. um sehr gute Aktivatoren des mononukleärophagozytären Systems und der Komplementkaskade.

G. ZUSAMMENFASSUNG

1. Chemie und Analytik

1.1. Aus den oberirdischen Teilen der südamerikanischen Asteraceae **Achyrocline satureioides** (Lam.) DC. wurden drei Polysaccharide in reiner Form dargestellt.

1.1.1. Das aus der 1 + 0,5 Ethanolfällung eines wässrig-alkalischen Extraktes gewonnene **4-O-Methylglucuronoxylan** (AS 1) weist ein Molekulargewicht von 43.000 D auf. Seine Hauptkette setzt sich aus (1→4)-verknüpften Xyloseeinheiten zusammen, von denen ca. 15 % Verzweigungspunkte am C2-OH aufweisen.

1.1.2. Die aus dem Wasserextrakt isolierten **Glykanogalakturonane** AS 3 und AS 4 besitzen Molekulargewichte von 7.600 D bzw. 15.000 D. Ihre Hauptketten sind aus (1→2)-verknüpften Rhamnoseresen und (1→4)- α -gebundenen Galakturonsäureeinheiten aufgebaut, die bei AS 3 zu 48,1 % und bei AS 4 zu 39,7 % mit Methanol verestert vorliegen. Ein Drittel aller Rhamnosemoleküle in AS 3 und alle Rhamnoseeinheiten in AS 4 tragen Seitenketten in Position C-4.

Diese Seitenketten enthalten in AS 3 entweder (1→4)-verknüpfte Galaktosereste mit einer terminalen Arabinoseeinheit, (1→4)-verknüpfte Xylosemoleküle mit ca. 50 % endständigen Arabinoseresen oder (1→3)-gebundene Arabinanketten. Im Unterschied zu AS 3 tragen die Galaktan- und Xylanketten in AS 4 keine terminalen Arabinoseeinheiten.

1.2. Aus dem Wasserextrakt der oberirdischen Teile von **Arnica montana** L. wurde ein Oligosaccharid (AH 1) mit einem Molekulargewicht von 1.800 D isoliert. Es läßt sich in die Gruppe der **Homogalakturonane** einordnen, besitzt eine unverzweigte Struktur und baut sich aus (1→4)- α -verknüpften Galakturonsäuremolekülen auf. 60 % seiner Carboxylgruppen liegen mit Methanol verestert vor.

- 1.3. Aus dem Nährmedium von **Arnica montana L.** Zellkulturen wurden zwei Polysaccharide in reiner Form isoliert.

1.3.1. Das neutrale Polysaccharid A I mit einem mittleren Molekulargewicht von 22.500 D stellt ein **Fucogalaktoxyloglucan** dar. Seine Hauptkette setzt sich aus (1→4)- β -gebundenen Glucoseresten zusammen. Von diesen bilden etwa zwei Drittel Verzweigungsstellen in Position C-6. Die Seitenketten weisen (1→2)- β -verknüpfte Galaktoseeinheiten, (1→2)- α -gebundene Xylosemoleküle sowie terminale Fucose-, Galaktose-, Arabinose- und Xylosereste auf.

- 1.3.2. Das saure Polysaccharid A II kann in die Gruppe der **Arabino-3,6-galaktan-Proteine** eingeordnet werden. Es besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 100.000 D und weist einen Proteinanteil von 6,3 % auf. Dieser enthält größere Mengen der Aminosäuren Alanin und Serin.

Die Hauptkette des Kohlenhydratanteiles besteht aus (1→3)- β -verknüpften Galaktoseeinheiten, die zu 66 % Verzweigungsstellen in Position C-6 aufweisen. An diese sind kurze, (1→6)- β -verknüpfte Seitenketten gebunden, die zum größten Teil in Position C-6 terminale, β -verknüpfte Arabinopyranosen tragen. Alternativ können auch in Position C-3 und C-6 kurze, (1→3)- α -verknüpfte Arabinanketten bzw. endständige, α -gebundene Arabino-furanosereste vorliegen.

- 1.4. Parallel zur großtechnischen Produktion und Aufarbeitung von Polysacchariden aus **Echinacea purpurea L.** Zellkulturen wurden verschiedene analytische und immunologische Untersuchungen durchgeführt:

- 1.4.1. Um die Reproduzierbarkeit der Polysaccharidproduktion während der Entwicklung neuer Aufbereitungsverfahren sicherzustellen, wurden Zuckeranalysen und ^{13}C -NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Aus der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen konnten kein Hinweis auf die strukturellen Voraussetzungen für TNF-stimulierende Aktivität bzw. den Stimulierungsgrad erhalten werden.

- 1.4.2. Zur Überprüfung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden aus zwei verschieden aktiven Rohpolysaccharidchargen aus dem Zellkulturnährmedium die Polysaccharide AG_{neu} und BAT 1 mit Molekulargewichten von 100.000 D bzw. 115.000 D nachisoliert. Beide können in die Gruppe der **Arabino-3,6-galaktan-Proteine** eingeordnet werden.

Die Hauptkette von BAT 1 baut sich aus (1→3)- β -gebundenen Galaktoseeinheiten auf, von denen 80 % Verzweigungsstellen in Position C-6 bilden. An diese sind kurze, (1→6)- β -Galaktanketten gebunden, die ihrerseits wieder in Position C-6 terminale, β -verknüpfte Arabinopyranoseeinheiten tragen oder in Position C-3 und C-6 (1→3)- α -gebundene Arabinanketten bzw. endständige, α -verknüpfte Arabinofuranosereste aufweisen.

AG_{neu} zeigt einen niedrigeren Verzweigungsgrad der Hauptkette und enthält einen geringeren Anteil an (1→3)- α -gebundenen Arabinanseitenketten. Stattdessen binden zahlreiche α -verknüpfte Arabinofuranoseeinheiten direkt an das Galaktangrundgerüst.

- 1.4.3. Zwischen dem ursprünglichen Arabinogalaktan AG und den nachisolierten Verbindungen zeigten sich teilweise erhebliche strukturelle Unterschiede. AG weist keinen Proteinanteil auf; es enthält keine β -gebundenen, endständigen Arabinopyranoseeinheiten und keine (1→3)- α -gebundenen Arabinosereste. Demgegenüber fehlt den nachisolierten Polysacchariden AG_{neu} und BAT 1 der für AG charakteristische, komplexe Arabinanteil.
- 1.4.4. Mit Hilfe der Atom-Absorptions-Spektroskopie wurden verschiedene Polysaccharidfraktionen aus großtechnischer Produktion auf ihren Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumgehalt untersucht. Dieser variiert teilweise erheblich, steht jedoch in keinem Zusammenhang zur TNF-stimulierenden Aktivität der Polysaccharidfraktionen.
- 1.4.5. Untersuchungen der Polysaccharide im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test und eine mit ihnen an speziellen Gelmaterialien durchgeführte Affinitätschromatographie zur LPS-Entfernung bestätigten, daß die TNF-Stimulierungen der aktiven Polysaccharide und Fraktionen nicht durch Kontaminationen mit Lipopolysacchariden hervorgerufen werden.

2. Pharmakologie

Bei den pharmakologischen Untersuchungen erwiesen sich insbesondere das Glykanogalakturonan **AS 4** und eine dieses Polysaccharid enthaltende Fraktion **AS Fr.** sowie das Arabino-3,6-galaktan-Protein **A II** als sehr aktiv.

- 2.1. Bei der in-vitro-Messung der Chemilumineszenz und im Carbon-Clearance-Test in vivo rief AS 4 eine starke Stimulierung von Granulozyten bzw. eine **Aktivierung des mononukleärophagozytären Systems** hervor.
- 2.2. AS 3 und AS 4 zeigten sehr gute **antikomplementäre Wirkungen** auf beide Wege der Komplementkaskade. Damit ist erstmals auch für Vertreter aus der Klasse der Glykanogalakturonane eine solche Wirkung beschrieben. A II übte vergleichbar starke Einflüsse nur auf den Alternativen Weg aus. Eine Immunfixation der Komponente C3 und des Faktors B bewies für AS 4 und A II die Fähigkeit zur **Aktivierung des Alternativen Weges**.
- 2.3. Eine sehr gute, lymphozytenproliferationsfördernde Wirkung konnte für AS 4 nachgewiesen werden.
- 2.4. Im Rattenpfotenödemtest erwies sich AS Fr. als etwa siebeneinhalbmals stärker **antiphlogistisch** wirksam als die Referenzsubstanz Indometacin. Die beiden reinen Glykanogalakturonane AS 3 und AS 4 zeigten im Bereich zwischen ein bis fünf Stunden nach Carrageenanprovokation ebenfalls stark entzündungshemmende Eigenschaften. Mit den Glykanogalakturonanen konnten damit zwei neue, hochmolekulare, antiphlogistische Wirkprinzipien erkannt werden.
- 2.5. AS Fr., AS 4 und A II führten zu einer guten **Freisetzung des TNF- α** , wobei besonders AS Fr. noch in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen starke Stimulierungen auslöste. Im Zusammenhang mit der durch dieses Monokin bekanntermaßen ausgelösten Lymphozytenproliferation ist anzunehmen, daß die vor allem für das Glykanogalakturonan AS 4 ermittelte Lymphozytenstimulierung als Folgereaktion des zuvor sezernierten TNF- α bewertet werden kann.

H. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Herkunft der Drogen

1.1. **Achyrocline satureioides (Lam.) DC.**

Die luftgetrocknete, grob pulverisierte Droge stellte uns die Firma Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe, im August 1985 zur Verfügung.

1.2. **Arnica montana L.**

Die luftgetrocknete, geschnittene Droge bezogen wir im Juli 1987 von der Firma A. Galke GmbH, Gittelde/Harz.

1.3. **Arnica montana L. Zellkulturen**

Die Zellkulturen von **Arnica montana L.** wurden im Labor von Prof. Dr. M. H. Zenk, Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, aus sterilen Blatt- und Stengelteilen von Pflanzenbeständen des Botanischen Gartens, München, angelegt. Nachdem sich der Kallus auf festen LINSMAIER-SKOOG-Nährböden etabliert hatte, folgte seine Überführung in flüssiges Nährmedium. Die Produktion der Suspensionskulturen fand dann in 1 l Erlenmeyerkolben mit 250 ml Nährmedium in zweiwöchigem Rhythmus bei 26° C statt.

1.4. **Echinacea purpurea Rohpolysaccharide**

Die Rohpolysaccharidfraktionen von **Echinacea purpurea (L.) Moench** stellte uns die Fa. Diversa, Hamburg, aus großtechnischer Fermenterproduktion freundlicherweise zur Verfügung.

2. Allgemeine Arbeitsmethoden

2.1. Physikalisch-chemische Untersuchungen

2.1.1. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Gerät:	Kernresonanzspektrometer AM-360 (90,56 MHz), Fa. Bruker
Lösungsmittel:	D_2O 99,75 %
Standard:	Methanol intern, 49,00 ppm von TMS Dioxan intern, 66,60 ppm von TMS
Temperatur:	50° C, falls nicht anders angegeben

Die Verschiebungen der Signale werden nach der δ -Skala in ppm angegeben.

2.1.2. CHN-Analysen

Gerät:	CHN-Analysator 185 (Fa. Hewlett Packard)
Einwaage:	2 - 3 mg

2.1.3. Polarimeter Messungen

Gerät:	Perkin-Elmer Polarimeter 241
Küvette:	Volumen: 1 ml Länge l: 10 cm
Wellenlänge:	Messung der optischen Drehung der Polysaccharidfraktionen bei 365 nm (Hg), wässrige Lösung.

2.1.4. Bestimmung der optischen Drehung (DAB 9)

Gerät und Küvette siehe 2.1.3.

Wellenlänge: $\lambda = 589 \text{ nm (Na)}$

Konzentration c: 0,1 %

Lösungsmittel: $\text{H}_2\text{O dest.}$

Durchführung: Eine 0,1 %ige Lösung der Substanz in 20,0° C warmem Wasser wurde zehnmal hintereinander gemessen und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert α gebildet. Dieser wurde in die Formel eingesetzt und die optische Drehung berechnet.

Optische Drehung:
$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

2.1.5. Zuckeranalysator

Gerät: Biotronik ZA 5100

Säule: DA-X4-20, Durrum, 0,6 cm x 27 cm

Säulentemperatur: 58° C

Eluens: 0,3 M Boratpuffer pH 9,1

Farbreagenz: Orcin / Schwefelsäure

Durchfluß: 60 ml / h

2.1.6. Gaschromatographie

Geräte: a) Perkin-Elmer 900 (für gepackte Säulen)
b) Perkin-Elmer Sigma 1 B (für Kapillarsäulen)

Trärgas: Argon

Detektor: FID

Temperatur: Detektor, Einspritzblock: 250° C

Trennung partiell methylierter Alditolacetate

- Säulen:
- a) OV 225, 25 m, 0,23 mm ID, Chrompack 14024-Kapillarsäule
Temperatur: 210° C isotherm
 - b) CP Sil 19 CB, 25 m, 0,23 mm ID, Chrompack WCOT Fused Sil. Kapillarsäule
Temperaturprogramm: 150° C / 3 min, dann 5° C / min bis 210° C

Trennung der Alditolacetate (quantitative Neutralzuckerbestimmung)

- Säule: Glas, 6 ft x 2 mm, GP 3 % SP-2330 auf 100 / 200 Supelcoport
- Temperatur:
- a) 225° C isotherm
 - b) Programm: 200° C / 2 min, dann 2° C / min bis 250° C

2.1.7. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS-Verfahren)Gaschromatographie

Gerät A: Carlo Erba (Mailand) Fraktovap 2110

- Trärgas: Helium, 1,8 ml / min
- Säule: OV 225, 25 m, 0,23 mm ID, Chrompack 14024-Kapillarsäule
- Temperatur: 150° C / 3 min, dann 5° C / min bis 210° C

Gerät B: Carlo Erba (Mailand) Kratos MFC 500

- Trärgas: Argon, 0,8 ml / min
- Säule: OV 225, 25 m, ID 0,23 mm, Chrompack 14024-Kapillarsäule
- Temperatur: 150° C / 3 min, dann 5° C / min bis 210° C

Massenspektrometer

Gerät A: Varian CH 7A
gekoppelt mit dem Datensystem Varian 188-MS

Gerät B: Kratos MS 80 RFA

Energiequelle in beiden Fällen: 70 eV

2.2. **HP-GPC-Methode**

Verwendete Säulen:	μ -Porasil GPC 60 A	Fa. Waters
	μ -Bondagel E-125	Fa. Waters
	μ -Bondagel E-500	Fa. Waters

Die Chromatographie erfolgte entweder mit μ -Porasil GPC 60 A allein oder mit nach steigendem Elutionsvolumen in Reihe geschalteter μ -Bondagel E-125. Daneben gelangte auch ein System aus μ -Bondagel E-125 und μ -Bondagel E-500 zum Einsatz. Dem jeweiligen System vorgeschaltet wurde eine Vorsäule (l=10 cm, Fa. Bischoff) mit I-125-Proteinmaterial.

Pumpen:	Fa. Lewa, Stuttgart
	Fließgeschwindigkeit 16 ml / h
	Gilson Modell 303 mit Manometer Modell 802,
	Fa. Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
	Fließgeschwindigkeit 30 ml / h

Einspritzblock:	Waters Associates
Einspritzmenge:	5 - 15 μ l einer 1 %igen Lösung
Detektoren:	Differentialrefraktometer R 401, Fa. Waters
	UV-Detektor LKB 2158 Uvicord SD, 206 nm

2.3. Säulenchromatographie

Verwendete Gele:	Sephacryl S-400 HR	Fa. Pharmacia
	Sephacryl S-400 superfine	Fa. Pharmacia
	Sephacryl S-300 superfine	Fa. Pharmacia
	Fraktogel TSK HW-50 (S)	Fa. Pharmacia
	Biogel P 2	Fa. Biorad
	DEAE-Sepharose CL-6B	Fa. Pharmacia
	Amberlite AG IRA-401, 20 - 50 mesh	Fa. Serva
	Polymyxin B-Agarose	Fa. Sigma
Eluens:	H ₂ O dest.	
	0,2 M NaCl	
	0 - 1,0 M NaCl	
	0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl 1 M Essigsäure	
Säulen:	analytisch:	A = 2,0 cm ² h = 90 cm
		A = 2,0 cm ² h = 85 cm
		A = 2,0 cm ² h = 60 cm
		A = 2,0 cm ² h = 53 cm
		A = 2,0 cm ² h = 25 cm
		A = 0,8 cm ² h = 22 cm
	präparativ:	A = 0,8 cm ² h = 6 cm
		A = 5,3 cm ² h = 30 cm
Auftragemengen:	a) analytisch:	10 - 30 mg
	b) präparativ:	100 - 400 mg
Pumpe:	LKB 2132 Microperpex-Pumpe	
	kalibriertes Volumen 1 ml	
	Schlauchdurchmesser 1,3 mm	
	Förderstrom 1 - 99 ml / h	

Detektoren: Differentialrefraktometer R 401, Fa. Waters
 UV-Detektor LKB 2238 Uvicord S II, UV-Filter
 206 nm

2.4. Dünnschichtchromatographie

Adsorbentien: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC
 (HPTLC), 10 x 20 cm (Fa. Merck)
 Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten, 20 x 20 cm,
 (Fa. Merck)

2.4.1. Monosaccharide:

Anreicherung:

5 bis 10 mg saures Polysaccharid wurden mit 2 ml 2 M Trifluoressigsäure 90 min bei 121° C im Trockenschrank hydrolysiert, die Säure anschließend abrotiert, der Rückstand in 2 ml Wasser aufgenommen, auf eine Säule (A = 0,8 cm², l = 22 cm) mit Amberlite AG IRA-401 Anionenaustauschermaterial in der Acetatform aufgepumpt und daraufhin mit Wasser eluiert. Die ersten acht Fraktionen mit je 5 ml Volumen wurden aufgefangen, anschließend die Säule mit 1 M Essigsäure gespült, die ersten acht sauren Fraktionen vereinigt, einrotiert, zweimal mit wenig Wasser nachgewaschen und dann der Rückstand in wenig Wasser gelöst. Diese angereicherte saure Fraktion wurde neben der durch Vereinigung der zweiten und dritten neutralen Fraktion gewonnenen Neutralfraktion zur Dünnschichtchromatographie verwendet.

Laufmittelsysteme: neutral: Chloroform - Methanol - Wasser
 64 : 14 : 8
 sauer: n-Butanol - Aceton - Essigsäure - Wasser
 35 : 35 : 10 : 20

Detektion: Anilindiphenylaminophosphorsäure:
2 ml Anilin
2 g Diphenylamin
10 ml Phosphorsäure
ad 100 ml Methanol
Farbreaktion im vis nach 10 min im Trockenschrank bei 100° C

2.4.2. Flavonoide:

Extraktherstellung:

10 g gepulverte Droge wurden mit 100 ml Methanol 5 min auf dem Wasserbad erwärmt, filtriert und einrotiert. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und zweimal mit je 15 bis 20 ml Chloroform ausgeschüttelt, anschließend zweimal mit je 15 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten Ethylacetatphasen auf 0,5 ml eingengt. 30 µl wurden zur DC aufgetragen.

Laufmittelsystem: Ethylacetat - Ameisensäure - Eisessig - Wasser
100 : 11 : 11 : 26

Detektion: a) UV 254 nm
b) Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz:
1 % meth. Diphenylborsäure-β-ethylaminoester
5 % eth. Polyethylenglykol 4000 Lösung
Beide Lösungen nacheinander aufsprühen,
Auswertung im UV-Licht bei 365 nm

2.4.3. Sesquiterpenlactone:

Extraktherstellung:

10 g gepulverte Blüten wurden mit 120 ml heißem Wasser übergossen, nach 5 min filtriert und die erhaltenen 60 ml des wässrigen Auszugs zweimal mit 90 ml Chloroform ausgeschüttelt. Nach Einrotieren der vereinigten

Chloroform-Phasen zur Trockene wurde der Rückstand in 0,3 ml Chloroform aufgenommen und 70 μ l zur DC aufgetragen.

Laufmittelsystem: n-Pentan - Diethylether
25 : 75

Detektion: a) UV 254 nm
b) Anisaldehyd / H_2SO_4 -Reagenz:
1,0 ml Anisaldehyd
97,0 ml Eisessig
2,0 ml H_2SO_4 konz.
Farbreaktion im vis nach 5 - 10 min im Trockenschrank bei 100° C
c) Zimmermann-Reagenz:
A: 10 g 1,3-Dinitrobenzol
90 ml Benzol
B: 6 g NaOH
25 ml H_2O
45 ml MeOH
Lösungen A und B nacheinander auf die DC-Platte sprühen; rasch verblassende Farbreaktion im vis

2.5. Dialyse

Dialysierschläuche: Servapor-Dialysierschläuche der Fa. Serva
Porendurchmesser: durchschnittlich 1,5 bis 2,0 nm

2.6. Uronsäurebestimmung

2.6.1. Nach BITTER *et al.* 1962

Reagenzien: a) 0,025 M Dinatriumtetraborat-10-hydrat p.A. in konz. H_2SO_4
b) 0,125 % Carbazol p. A. in Ethanol p. A.

- c) Galakturonsäuremonohydrat, 24 h über P_2O_5 getrocknet, gelöst in mit Benzoesäure p. A. gesättigtem, destilliertem Wasser in Konzentrationen von $4\text{ }\mu\text{g}$ - $40\text{ }\mu\text{g/ml}$
- d) Probenlösungen: $0,1\text{ mg/ml}$ destilliertes, mit Benzoesäure p. A. gesättigtes Wasser

Durchführung:

5 ml konz. Schwefelsäure-Reagenz a) werden im Eisbad vorsichtig mit 1 ml Proben-d) bzw. Standardlösung c) überschichtet, erst vorsichtig, dann kräftig geschüttelt und 10 min in siedendem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zugabe von $0,2\text{ ml}$ Carbazolreagenz b) schließt sich ein 15 minütiges Erhitzen im Wasserbad an. Die Messung der Extinktion erfolgt nach Abkühlen gegen einen Blindwert bei einer Wellenlänge von 530 nm .

2.6.2. Nach WARDI et al. 1974

Reagenzien:

- a) konz. H_2SO_4
- b) $0,2\text{ }\%$ Harmin p. A. in Ethanol p. A.
- c) Galakturonsäuremonohydrat, 24 h über P_2O_5 getrocknet, gelöst in destilliertem Wasser in Konzentrationen von $4\text{ }\mu\text{g}$ - $40\text{ }\mu\text{g/ml}$
- d) Probenlösungen: $0,1\text{ mg/ml}$ destilliertes Wasser

Durchführung:

1 ml Proben- d) bzw. Standardlösung c) werden im Eisbad mit 4 ml konz. Schwefelsäure a) vermischt und nach kräftigem Schütteln in einem siedenden Wasserbad 20 min erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zugabe von $0,2\text{ ml}$ Harminlösung b) erfolgt die Messung der Extinktion gegen einen Blindwert bei einer Wellenlänge von 530 nm .

2.7. Proteinbestimmung nach LOWRY 1951

- Reagenzien:
- a) alkalisches Kupferreagenz
 - 1 ml 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - 1 ml 2 % K,Na-tartrat
 - 20 ml 10 % Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH
 - b) Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
(Fa. Merck Art. Nr. 9001)
 - 1 : 10 mit H_2O dest. verdünnt
 - c) Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 10 μg
- 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H_2O dest.
 - d) Probenlösung: 1 mg / ml H_2O dest.

Durchführung:

1 ml Proben- d) bzw. Standardlösung c) werden mit 1 ml alkalischem Kupferreagenz a) versetzt. Nach 15 Minuten erfolgt die Zugabe von 3 ml Folinreagenz b), an die sich sofortiges, kräftiges Schütteln des Ansatzes anschließt. Die Messung der Extinktion findet nach 45 Minuten gegen einen Blindwert bei einer Wellenlänge von 540 nm statt.

2.8. Neutralzuckerbestimmung

- Hydrolysebedingungen: siehe H.3.9.2.
Derivatisierung: siehe H.3.10.1.
Gaschromatographie: siehe H.2.1.6.

2.9. Bestimmung des Veresterungsgrades mit Methanol nach WOOD *et al.* 1971

- Reagenzien:
- a) 2 %ige, wässrige Kaliumpermanganatlösung
 - b) 0,5 M Natriumarsenit in 0,12 N H_2SO_4
 - c) 0,05 M Pentan-2,4-dion in 2 M Ammoniumacetat
enthaltender 0,05 M Essigsäure
 - d) 1,5 N NaOH

- e) 5,5 N H_2SO_4
- f) Standardlösungen : 2 - 35 μg MeOH in je 1 ml 1 N H_2SO_4
- g) Probenlösungen: 50 - 200 μg in je 0,5 ml H_2O

Durchführung:

Die Probenlösungen g) werden mit 0,25 ml NatronlaugeLösung d) versetzt, gut geschüttelt und 45 Minuten verseift. Die Reaktionsansätze werden anschließend mit 0,25 ml Lösung e) angesäuert und gemeinsam mit den Standardlösungen f) in einem Eiswasserbad vorsichtig mit 0,2 ml Lösung a) überschichtet. Die Mischungen werden vorsichtig geschüttelt und nach 15 Minuten im Eisbad mit 0,2 ml Lösung b) überschüssiges Kaliumpermanganat zerstört. Die Ansätze werden mit 0,6 ml Wasser auf 2 ml aufgefüllt, gut geschüttelt und eine Stunde bei Raumtemperatur allmählich entfärbt. Nach Zugabe von 2 ml Lösung c) werden die Mischungen in einem auf genau 58° C temperierten Wasserbad heftig geschüttelt und nach genau 5 Minuten herausgenommen. Die Messung erfolgt 10 Minuten später bei einer Wellenlänge von $\lambda = 412 \text{ nm}$ gegen einen Blindwert.

3. Spezielle Arbeitsmethoden

3.1. Isolierung der Polysaccharide aus *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Zu Beginn der Isolierung unterzogen wir 630 g gepulverte, getrocknete, oberirdische Teile der Pflanze einer erschöpfenden Soxhletextraktion mit Petrolether und Methanol. Vor der weiteren Aufarbeitung trockneten wir die Droge unter einer IR-Lampe. Alle nachfolgend beschriebenen Vorgänge fanden, falls nicht gesondert erwähnt, bei 4° C statt.

3.1.1. Gewinnung von Rohpolysacchariden aus wässrigem Extrakt

Etwa 540 g entfettete Droge wurde 24 Stunden mit demineralisiertem Wasser im Verhältnis 1 : 10 unter Rühren ausgezogen. Nach Abpressen der Droge wurde der Wasserextrakt filtriert und unter reduziertem Druck bei 40° C auf ein Fünftel seines Volumens eingengt. Es folgte eine 48 stündige Dialyse gegen demineralisiertes Wasser und die Gefriertrocknung des Dialysates.

Ausbeute: 6,492 g = 1,03 % der getrockneten Droge

3.1.2. Isolierung der Einzelkomponenten AS 3 und AS 4 aus dem Wasserextrakt

3.1.2.1. Anionenaustauschchromatographie:

Austauschermaterial:	DEAE-Sepharose CL-6B
Säule:	A = 2,0 cm ² I = 25 cm
Eluens:	H ₂ O dest.
Durchfluß:	30 ml / h
Auftragmenge:	ca. 300 mg Wasserextrakt
Gradient:	0 - 1 M NaCl (250 - 250)

Ausbeute:	Neutralfraktion :	40 ml - 90 ml = 3,4 %
	Fraktion 1:	160 ml - 270 ml = 8,5 %
	Fraktion 2:	290 ml - 400 ml = 10,5 %
	bezogen auf den eingesetzten Wasserextrakt	

3.1.2.2. Gelfiltrationschromatographie:

Reinigung der Fraktion 2 (= AS Fr.)

Gelmaterial:	Fraktogel TSK HW-50 (S)
Säule:	$A = 2,0 \text{ cm}^2$ $l = 85 \text{ cm}$
Eluens:	0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl
Durchfluß:	5 ml / h
Auftragemenge:	ca. 30 mg Fraktion 2
Ausbeute:	Fraktion 2/1: 58 ml - 73 ml = 38,2 % Fraktion 2/2: 73 ml - 98 ml = 40,9 % bezogen auf die eingesetzte Fraktion 2

Reinigung der Fraktion 2/2

Chromatographische Bedingungen siehe Reinigung der Fraktion 2

Auftragemenge:	ca. 25 mg Fraktion 2/2
Ausbeute:	Polysaccharid AS 3: 64 ml - 75 ml = 51,5 % bezogen auf die eingesetzte Fraktion 2/2; ca. 0,01 % bezogen auf die getrocknete Droge

Reinigung der Fraktion 2/1

Chromatographische Bedingungen siehe Reinigung der Fraktion 2

Auftragemenge:	ca. 25 mg Fraktion 2/1
----------------	------------------------

Ausbeute: **Polysaccharid AS 4:** 62 ml - 68 ml = 53,4 %
bezogen auf die eingesetzte Fraktion 2/1;
ca. 0,01 % bezogen auf die getrocknete Droge

3.1.3. Gewinnung von Rohpolysacchariden aus alkalisch-wässrigem Extrakt modifiziert nach CALDES *et al.* 1981

Die nach 3.1.1. vorbehandelte Droge wurde im Verhältnis 1 : 20 in 2 % Na₂EDTA-Lösung suspendiert und 48 Stunden unter Rühren ausgezogen (SIDDQUI *et al.* 1974). Anschließend wurde die Droge abgepreßt und der gewonnene Extrakt verworfen.

Danach wurde der abgepreßte Drogenrückstand in der zehnfachen Menge 0,5 N NaOH resuspendiert und 36 Stunden mazeriert. Im Anschluß wurde der schwarze Rückstand abfiltriert, mit 2 l 0,5 N NaOH nachgewaschen und die vereinigten Filtrate unter andauerndem Rühren durch langsames Zutropfen mit dem dreifachen Volumen 96% Ethanol versetzt. Der goldgelbe Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, verworfen und der sich über Nacht gebildete Niederschlag durch Zentrifugation (10.000 Upm, 1 h) von der verbleibenden Lösung abgetrennt.

Der in etwa 1 l Wasser gelöste Niederschlag wurde anschließend im Eisbad durch langsames Zutropfen einer Fällung mit 15 %iger Trichloressigsäurelösung im Verhältnis 1 + 1 unterworfen und daraufhin 1 Stunde im Eisbad belassen. Nach Abzentrifugieren und Verwerfen des Rückstandes wurde der klare, dunkelbraune Überstand wiederum langsam mit der vierfachen Menge Alkohol versetzt und der sich über Nacht gebildete, hellbeige Niederschlag am nächsten Morgen abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in wenig zweiprozentiger Natriumacetatlösung (120 ml) aufgenommen und durch Filtrieren von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt.

Zur fraktionierten Alkoholfällung (BLAKE *et al.* 1971) wurde diese Lösung tropfenweise unter ständigem Rühren mit dem halben Volumen 96 %igem Ethanol versetzt, der Niederschlag nach 24 Stunden abzentrifugiert, 48 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Behandlung des Überstandes mit der gleichgroßen, zweifachen und vierfachen Menge Alkohol wurde identisch durchgeführt und die dabei auftretenden Niederschläge jeweils ebenfalls gefriergetrocknet.

Ausbeute:	1 + 0,5 Fällung	2,808 g = 0,44 %
	1 + 1 Fällung	0,366 g = 0,058 %
	1 + 2 Fällung	0,203 g = 0,032 %
	1 + 4 Fällung	0,005 g = 0,0008 %
	bezogen auf die getrocknete Droge	

3.1.4. Isolierung der Einzelkomponente AS 1 aus der 1 + 0,5 Fällung

3.1.4.1. Anionenaustauschchromatographie:

Vor dem Aufpumpen auf die Säulen wurden unlösliche Bestandteile der Probenlösungen abzentrifugiert. Die Elution mit 1 bis 1,5 Säulenvolumina H_2O dest. führte nicht zur Abtrennung neutraler Polysaccharide. Saure Fraktionen wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten abgelöst. Alle Fraktionen wurden 48 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Austauschermaterial: DEAE-Sephrose CL-6B

Säule:	A = 5,3 cm ²	
	l = 30 cm	
Eluens:	H_2O dest.	
Durchfluß:	25 ml / h	
Auftragemenge:	420 mg 1 + 0,5 Fällung	
Gradient:	0 - 1 M NaCl (250 - 250)	
Ausbeute:	Fraktion 1:	162 ml - 268 ml = 35,0 %
	Fraktion 2:	300 ml - 356 ml = 12,0 %
	bezogen auf die eingesetzte 1 + 0,5 Fällung	

3.1.4.2. Gelfiltrationschromatographie:

Gelmaterial:	Sephacryl S-400 superfine
Säule:	A = 2,0 cm ² l = 60 cm
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	18 ml / h
Auftragemenge:	20 mg Fraktion 1
Ausbeute:	Polysaccharid AS 1:85 ml - 117 ml = 81,0 % bezogen auf die eingesetzte Fraktion 1; ca. 0,05 % bezogen auf die getrocknete Droge

3.2. **Isolierung der Polysaccharide aus *Arnicae montanae* L. herba**

3.2.1. Gewinnung von Rohpolysacchariden aus dem wässrigen Extrakt

Zu Beginn der Isolierung unterzogen wir 750 g gepulverte Droge nacheinander einer erschöpfenden Soxhletextraktion mit Petrolether, Chloroform und Methanol und trockneten vor der weiteren Aufarbeitung den Drogenrückstand unter einer IR-Lampe. Alle nachfolgend beschriebenen Vorgänge fanden, falls nicht gesondert erwähnt, bei 4° C statt.

Etwa 615 g getrockneter, entfetteter Drogenrückstand wurden 24 Stunden mit 5 Liter demineralisiertem Wasser unter Rühren ausgezogen. Nach Abpressen der Droge wurde der Wasserextrakt filtriert und unter reduziertem Druck bei 40° C auf ein Drittel seines Volumens eingeeengt, dann langsam unter Rühren mit demselben Volumen Ethanol versetzt. Am nächsten Morgen wurde der klare Überstand vorsichtig abdekantiert, der Niederschlag von der verbleibenden Lösung abzentrifugiert (1 Stunde, 10.000 Upm) und der Überstand mit der abdekantierten Lösung vereinigt. Durch Zugabe von drei weiteren Volumenteilen Ethanol zu dieser Lösung in identischer Weise erhielten wir als Niederschlag das 1 + 4 Fällungsprodukt. Beide Rohpolysaccharide wurden in wenig Wasser gelöst, 24 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1 + 1 Fällung 5,56 g = 0,74 %
 1 + 4 Fällung 2,20 g = 0,29 %
 bezogen auf die getrocknete, pulverisierte Droge

3.2.2. Isolierung der Einzelkomponente AH 1 aus der 1 + 1 Fällung

3.2.2.1. Anionenaustauschchromatographie:

Austauschermaterial: DEAE-Sepharose CL-6B

Säule: A = 2,0 cm²
 l = 25 cm

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 30 ml / h

Auftragemenge: ca. 130 mg 1 + 1 Fällung

Gradient: 0 - 1 M NaCl (250 - 250)

Ausbeute: Neutralfraktion: 30 ml - 60 ml = 1,94 %
 Fraktion a: 212 ml - 218 ml = 2,02 %
 Fraktion b: 235 ml - 262 ml = 4,68 %
 Fraktion c: 262 ml - 290 ml = 8,93 %
 Fraktion d: 290 ml - 312 ml = 14,12 %
 Fraktion e: 312 ml - 350 ml = 23,66 %
 Fraktion f: 400 ml - 460 ml = 1,50 %
 bezogen auf die eingesetzte 1 + 1 Fällung

3.2.2.2. Gelfiltrationschromatographie:

Reinigung von Fraktion d (= AH Fr.)

Gelmaterial: Fraktogel TSK HW-50 (S)

Säule: A = 2,0 cm²
 l = 85 cm

Eluens: 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 NaCl

Durchfluß: 5 ml / h

Auftragemenge: ca. 30 mg Fraktion d

Ausbeute: Fraktion d/1: 82 ml - 85 ml = 11,7 %
bezo-gen auf die eingesetzte Fraktion d

Reinigung von Fraktion d/1

Chromatographische Bedingungen siehe Reinigung von Fraktion d

Auftragsmenge: ca. 25 mg Fraktion d/1
Ausbeute: **Polysaccharid AH 1:** 83 ml - 88 ml = 50,5 %
bezo-gen auf die eingesetzte Fraktion d/1;
ca. 0,0016%, bezo-gen auf die getrocknete Droge

3.3. **Isolierung der Polysaccharide aus dem Zellkulturnährmedium von *Arnica montana* L.**

Die Zellmaterialbestandteile aus 10 l Suspensionskulturen wurden abfiltriert und gefriergetrocknet. Es ergaben sich 105,1 g gefriergetrocknetes Zellmaterial.

Das Filtrat wurde langsam und unter Rühren mit dem dreifachen Volumen an 96 %igem Ethanol versetzt. Die sich über Nacht gebildeten Niederschläge wurden anschließend vorsichtig durch Abdekantieren und Abzentrifugieren (1 Stunde, 10.000 Upm) von der überstehenden Lösung abgetrennt. Die vereinigten Zentrifugate wurden daraufhin in ca. 600 ml demineralisiertem Wasser gelöst und 48 h gegen das Lösungsmittel dialysiert, dann langsam unter Eiskühlung und Rühren mit demselben Volumen an 15 %iger Trichlor-essigsäure versetzt und nach einer Stunde abzentrifugiert (10.000 Upm, 30 min). Das Zentrifugat wurde verworfen und der klare Überstand sofort anschließend mit vier Volumenteilen 96 %igem Ethanol versetzt. Der sich über Nacht gebildete Niederschlag wurde abzentrifugiert und dann in 265 ml 2 %iger Natriumacetatlösung aufgenommen und vollständig gelöst. Durch langsame Zugabe von 1/2, 1, 2 und 4 Volumenteilen 96 %igem Ethanol auf dem Magnetrührer führten wir daraufhin eine fraktionierte Alkoholfällung durch, wobei die Fällungen jeweils am nächsten Morgen abzentrifugiert, dann 48 h gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet wurden.

Ausbeute:	1 + 0,5 Fällung	1,04 g = 1,0 %
	1 + 1 Fällung	0,876 g = 0,83 %
	1 + 2 Fällung	0,99 g = 0,94 %
	1 + 4 Fällung	0,095 g = 0,09 %
	bezogen auf 100 g gefriergetrocknetes Zellmaterial	

3.3.1. Isolierung der Einzelkomponenten A I und A II aus der 1 + 1 Fällung

3.3.1.1. Anionenaustauschchromatographie:

Austauschermaterial:	DEAE-Sepharose CL-6B
Säule:	A = 2 cm ² l = 25 cm
Eluens:	H ₂ O dest.
Durchfluß:	30 ml / h
Auftragmenge:	115 mg 1 + 1 Fällung
Gradient:	0 - 1 M NaCl (250 - 250)
Ausbeute:	neutrale Fraktion: 10 ml - 40 ml = 27,9 % saure Fraktion: 90 ml - 150 ml = 47,5 % bezogen auf die eingesetzte 1 + 1 Fällung

3.3.1.2. Gelfiltrationschromatographie:

Reinigung der neutralen Fraktion

Gelmaterial:	Sephacryl S-400 superfine
Säule:	A = 2,0 cm ² l = 90 cm
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	15 ml / h
Auftragmenge:	ca. 10 mg neutrale Fraktion
Ausbeute:	S-400 N Fraktion: 115 ml - 165 ml = 61,1 % bezogen auf die eingesetzte, neutrale Fraktion

Reinigung der Fraktion S-400 N

Gelmaterial:	Sephacryl S-300 superfine
Säule:	$A = 2,0 \text{ cm}^2$ $l = 90 \text{ cm}$
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	15 ml / h
Auftragemenge:	ca. 10 mg S-400 N Fraktion
Ausbeute:	Polysaccharid A I: 80 ml - 120 ml = 79,1 % bezogen auf die eingesetzte S-400 N Fraktion; 0,23 %, bezogen auf das gefriergetrocknete Zellmaterial

Reinigung der sauren Fraktion

Gelmaterial:	Sephacryl S-400 superfine
Säule:	$A = 2,0 \text{ cm}^2$ $l = 90 \text{ cm}$
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	15 ml / h
Auftragemenge:	ca. 10 mg saure Fraktion
Ausbeute:	S-400 S Fraktion: 120 ml - 145 ml = 36,8 % bezogen auf die eingesetzte saure Fraktion

Reinigung der Fraktion S-400 S

Gelmaterial:	Sephacryl S-300 superfine
Säule:	$A = 2,0 \text{ cm}^2$ $l = 90 \text{ cm}$
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	15 ml / h
Auftragemenge:	ca. 10 mg S-400 S Fraktion

Ausbeute: **Polysaccharid A II:** 70 ml - 100 ml = 81,2 %
bezogen auf die eingesetzte S-400 S Fraktion;
0,39 %, bezogen auf das gefriergetrocknete
Zellmaterial

3.4. Isolierung der Polysaccharide aus Rohpolysaccharidfraktionen großtechnischer Herkunft

Die Rohpolysaccharidfraktionen Mü 14 und die gepoolten Chargen CH 89, 90, 92 - 97 stellte uns freundlicherweise die Fa. Diversa, Hamburg, zur Verfügung. Sie entstammen verschiedenen Fermenterläufen und wurden durch Ultra-/Diafiltration gereinigt, wie in E.2.2. Abb. 41 dargestellt.

3.4.1. Isolierung der Einzelkomponente AG_{neu} aus der Fraktion Mü 14

3.4.1.1. Anionenaustauschchromatographie:

Austauschermaterial: DEAE-Sephrose CL-6B

Säule: A = 2 cm²
l = 25 cm

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 30 ml / h

Auftragemenge: ca. 100 mg Mü 14

Gradient: 0 - 1 M NaCl (250 - 250)

Ausbeute: Neutralfraktion 1: 0 ml - 30 ml = 18,2 %
Neutralfraktion 2: 30 ml - 60 ml = 1,1 %
saure Fraktion 1: 120 ml - 180 ml = 36,4 %
saure Fraktion 2: 210 ml - 240 ml = 0,5 %

3.4.1.2. Gelfiltrationschromatographie:

Reinigung der sauren Fraktion 1

Gelmaterial: Sephacryl S-400 HR

Säule:	$A = 2,0 \text{ cm}^2$ $l = 60 \text{ cm}$
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	18 ml / h
Auftragmenge:	ca. 25 mg saure Fraktion 1
Ausbeute:	AG_{neu} : 72 ml - 108 ml = 75,6 % bezogen auf die eingesetzte saure Fraktion 1 27,5 % bezogen auf Mü 14

3.4.2. Isolierung der Einzelkomponente BAT 1 aus dem Charginpool

3.4.2.1. Anionenaustauschchromatographie:

Austauschermaterial:	DEAE-Sephacrose CL-6B
Säule:	$A = 2 \text{ cm}^2$ $l = 25 \text{ cm}$
Eluens:	H ₂ O dest,
Durchfluß:	30 ml / h
Auftragmenge:	ca. 250 mg Charginpool
Gradient:	0 - 1 M NaCl (250 - 250)
Ausbeute:	Neutralfraktion a: 20 ml - 60 ml = 43,4 % Neutralfraktion b: 70 ml - 100 ml = 2,3 % saure Fraktion 1: 180 ml - 330 ml = 13,3 % saure Fraktion 2: 360 ml - 450 ml = 1,5 % bezogen auf den eingesetzten Charginpool

3.4.2.2. Gelfiltrationschromatographie:

Reinigung der sauren Fraktion 1

Gelmaterial:	Sephacryl S-400 HR
Säule:	$A = 2,0 \text{ cm}^2$ $l = 90 \text{ cm}$
Eluens:	0,2 M NaCl
Durchfluß:	15 ml / h

Auftragsmenge: ca. 15 mg saure Fraktion 1
 Ausbeute: **BAT 1:** 165 ml - 205 ml = 64,7 %
 bezogen auf die eingesetzte saure Fraktion 1
 7,0 %, bezogen auf den Chargenpool

3.5. Molekulargewichtsbestimmung (M_w) mit HP-Gelpermeationschromatographie

Säulensysteme: μ -Porasil GPC 60 A
 μ -Porasil GPC 60 A + μ -Bondagel E-125
 μ -Bondagel E-125 + μ -Bondagel E-500

Dem jeweiligen Säulensystem wurde eine Vorsäule (10 cm, Fa. Bischoff), gefüllt mit I-125 Proteinmaterial der Fa. Waters vorgeschaltet.

Eluens:
 0,2 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0
 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0 mit 0,15 M NaCl
 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl
 und 10 % DMSO
 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl
 und 20 % DMSO
 0,2 M Na-Acetatpuffer pH 4,0 mit 0,2 M NaCl
 30 % (G/G) Ethanol

Durchfluß: 16 ml / h Pumpe: Lewa
 30 ml / h Pumpe: Gilson

Eichsubstanzen:	Glucose	Fa. Merck
	Maltotriose	Fa. Sigma
	Maltoheptaose	Fa. Sigma
	Dextransulfat 5000	Fa. Sigma
	Dextran 10 T	Fa. Pharmacia
	Dextran 40 T	Fa. Pharmacia
	Dextran 70 T	Fa. Pharmacia
	Dextran 110 T	Fa. Pharmacia
	Dextran 500 T	Fa. Pharmacia
	Dextran 2000 T	Fa. Roth

Detektoren: Differentialrefraktometer R 401, Fa. Waters
UV-Detektor LKB 2158 Uvicord SD, 206 nm

Einspritzmenge: 15 µl einer 1 %igen Lösung

Auswertung:
$$K_D = \frac{V_E - V_O}{V_T - V_O}$$

Aus dem Elutionsvolumen der Substanz V_E (in Zentimetern aus dem Refraktometerchromatogramm abgelesen) wird nach obiger Formel der K_D -Wert der Substanz in Abhängigkeit von Total- (V_T) und Ausschlußvolumen (V_O) des jeweiligen Säulensystems berechnet. Aus den K_D -Werten der Eichsubstanzen, aufgetragen gegen ihren $-\lg M$, ergibt sich eine Eichgerade, aus deren linearem Bereich sich anhand des Substanz K_D -Wertes der Substanz $-\lg M$ ablesen läßt.

3.6. Versuche zur Endotoxinabtrennung durch Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose (ISSEKUTZ 1983)

Puffer: a) 0,1 M Na-acetat-Puffer pH 4,0 mit 0,5 M NaCl
b) 0,1 M Na-phosphat-Puffer pH 8,0 mit 0,5 M NaCl
c) H₂O dest. und pyrogenfrei

Zur Herstellung der Puffer und als Eluens kam nur pyrogenfreies Wasser zum Einsatz, das uns die Fa. Lomapharm, Emmerthal, freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Gelmaterial: Polymyxin B-Agarose

Säule: $A = 0,8 \text{ cm}^2$
 $l = 6 \text{ cm}$

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 10 ml / h

Auftragmenge: ca. 35 mg in 1 ml Eluens gelöst

Detektion: Anthrontest (SPIRO 1966, HAMPP 1986)
18 ml H_2SO_4 konz.
12,5 mg Anthron
250 mg Thiourea
7 ml H_2O dest.

Je zwei Tropfen jeder Fraktion zu je acht Tropfen Anthronreagenz in eine Mikrotiterplatte pipettieren und diese mit einem Deckel verschlossen 15 Minuten auf dem Dampfbad erhitzen; grüngelbe Färbung im vis.

Durchführung:

Sämtliche während der Ausführung verwendeten Geräte wurden zuvor einer zweistündigen Hitzesterilisation im Trockenschrank bei 200°C unterworfen. Alternativ setzten wir sterilverpackte Einmalartikel ein.

Das Gelmaterial wurde in Puffer a) suspendiert und in eine 5 ml Spritze eingefüllt. Anschließend folgten drei alternierende Waschgänge mit den Puffern b) und a) mit einer Durchflußrate von 30 ml / h, um dann die Säule mit 20 ml H_2O dest. zu equilibrieren. Dann wurde die Probe aufgepumpt und die Säule für zwei Stunden geschlossen. Es folgte die Fraktionierung in 1,5 ml Volumina, Durchflußrate 10 ml / h, wobei sich die zuckerhaltigen Fraktionen durch einen in der Mikrotiterplatte durchgeführten Anthrontest identifizieren ließen. Diese wurden vereinigt und nochmals auf die Säule aufgepumpt. Nach abermaliger Fraktionierung wurden die zuckerhaltigen Fraktionen direkt gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug ca. 65 %, bezogen auf die eingesetzte Menge Polysaccharid.

3.7. Acetylierung von Polysacchariden (ADAMS 1965)

1 bis 10 mg Polysaccharid werden in 0,4 ml Formamid gelöst. Nach Zusatz von 0,2 ml Pyridin und 0,15 ml Acetanhydrid wird der Ansatz 3 Stunden auf dem Magnetrührer gerührt. Die nach Zugabe von 10 ml eiskaltem

Wasser ausgefallenen, acetylierten Polysaccharide werden abzentrifugiert, das Zentrifugat zweimal mit je 1 ml Wasser gewaschen, in wenig Wasser suspendiert und gefriergetrocknet.

3.8. Darstellung der methylierten Alditolacetate nach HAKOMORI 1964

2 - 5 mg Substanz wurden in einer 50 ml Ampulle in 3 ml getrocknetem DMSO (Molekularsieb) unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades gelöst. Die Atmosphäre in der Ampulle wurde nach dem Versiegeln durch Begasen mit Stickstoff gesättigt. Anschließend wurden über eine Injektionsnadel 1 - 2 ml Natrium-methylsulfinylmethanid zugetropft. Der Ansatz wurde mehrere Stunden ultrabeschallt und dann unter Eiskühlung tropfenweise mit 1 - 2,5 ml Methyljodid versetzt, wobei eine zweite Kanüle für den notwendigen Druckausgleich sorgte. Im Anschluß wurde das Reaktionsgemisch dann über Nacht erneut einer Ultrabeschallung ausgesetzt. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz in einen Spitzkolben übergeführt und am Rotationsverdampfer bei 40° C von überschüssigem Methyljodid befreit. Die Lösung wurde jetzt 24 Stunden viermal gegen je 12 l demineralisiertes Wasser dialysiert und dann unter Vakuum zur Trockene eingeeengt.

Bei der Methylierung von Oligosacchariden wurde die Lösung stattdessen mit 10 ml H₂O dest. versetzt und viermal mit je 6 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden dann viermal mit 6 ml H₂O ausgeschüttelt und unter Vakuum zur Trockene eingeeengt.

Die weiteren Derivatisierungsschritte erfolgten nach 3.9.1. (Hydrolyse) und 3.10.2. (Acetylierung).

3.9. Hydrolysebedingungen

3.9.1. Methode A:

Zur Darstellung der Alditolacetate wurde der methylierte Rückstand von 3.8. mit 2 ml 90 %iger Ameisensäure 1 Stunde am Dampfbad erhitzt. Nach Entfernen der Ameisensäure am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in 2 - 3 ml 2 M Trifluoressigsäure aufgenommen und abermals 3 Stunden auf dem Dampfbad erhitzt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde die Trifluoressigsäure abrotiert. Die weitere Derivatisierung zu den partiell methylierten Alditolacetaten erfolgte nach 3.10.2..

3.9.2. Methode B (Quantitative Neutralzuckerbestimmung):

1 - 2 mg Polysaccharid wurden in einer 25 ml Glasampulle eingewogen und mit 1 - 2 ml 2 M Trifluoressigsäure versetzt. Nach dem Verbördeln des Gefäßes wurde die Lösung 90 min bei 121° C im Trockenschrank erhitzt. Nach Zugabe von 0,2 ml Inosit-Standardlösung wurde das Hydrolysat in einen 25 ml Spitzkolben überführt, zur Trockene eingeeengt, zweimal in je 2 ml MeOH aufgenommen und abermals einrotiert. Die weitere Derivatisierung erfolgt nach 3.10.1..

3.10. Darstellung der Alditolacetate

3.10.1. Methode A:

Das nach 3.9.2. hydrolysierte Polysaccharid wurde in 0,1 ml 1 M Ammoniak gelöst und nach Zugabe von 1 ml NaBH_4 -Lösung (2 % in DMSO) 90 min bei 40° C im Wasserbad reduziert. 0,4 ml anschließend zupipettierter Eisessig zerstörte überschüssiges NaBH_4 . 15 Minuten später erfolgte die Acetylierung des reduzierten Zuckergemisches durch Zusatz von 2 ml

Acetanhydrid und 0,2 ml 1-Methylimidazol. Der nach 15 Minuten mit 20 ml eiskaltem Wasser durchgeführten Hydrolyse von überschüssigem Essigsäureanhydrid schloß sich wiederum 15 Minuten später die Ausschüttelung der Alditolacetate mit ca. 0,5 ml Dichlormethan an. Die Unterphase wurde direkt zur GC-Analyse verwendet (BLAKENEY *et al.* 1983).

3.10.2. Methode B:

Die nach 3.9.1. vorbehandelten Polysaccharide wurden in 5 ml H₂O aufgenommen, mit einer Spatelspitze NaBH₄ bzw. NaBD₄ (alkalische Reaktion) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen. Überschüssiges Reduktionsmittel wurde anschließend durch Zugabe von ca. 2 ml Eisessig zerstört und die Lösung zur Trockene eingengt. Zur Boratentfernung wurde das Reaktionsgemisch viermal mit je 5 ml einer 3 : 2 Mischung aus Methanol und Essigsäure einrotiert. Der Rückstand wurde dann mit 1 ml einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin (1 : 1) versetzt und eine Stunde auf dem Dampfbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch vier- bis fünfmal mit Toluol zur Trockene eingengt, in 3 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit wenig Wasser ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Dichlormethanphase zur Trockene eingengt.

Zur gaschromatographischen Bestimmung wurden die Alditolacetate dann in wenig Dichlormethan gelöst. Die Identifizierung der partiell methylierten Alditolacetate erfolgte über eine GC / MS-Analyse.

3.11. **Enzymatische Hydrolyse mit Pektinase (COLLINS *et al.* 1981)**

1 mg Polysaccharid wurde zur Esterspaltung mit 1 ml 1 M Ammoniak versetzt und über Nacht verseift, dann einrotiert und fünfmal mit je 1 ml Methanol nachgewaschen. Der Rückstand wurde in 200 µl Wasser gelöst und mit 5 µl Pektinase 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der freigesetzten Galakturonsäure erfolgte dünnschichtchromatographisch.

3.12. Partialhydrolyse

10 - 30 mg Polysaccharid wurden mit 2,5 ml 0,05 M Trifluoressigsäure versetzt und 2 Stunden im Trockenschrank bei 100° C erhitzt. Anschließend wurde das Partialhydrolysat am Rotationsverdampfer eingengt, in wenig Wasser gelöst, dünnschichtchromatographisch untersucht, 24 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.13. Reduktion der Uronsäuren

3.13.1. Methode nach TAYLOR und CONRAD 1972

- Reagenzien:
- a) schweres Wasser (D_2O)
 - b) N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat
 - c) 0,01 N HCl
 - d) 4,0 N HCl
 - e) 2 M $NaBD_4$ -Lösung
 - f) Essigsäure + Methanol (1 + 9)
 - g) Methanol

Durchführung:

Ca. 10 mg Polysaccharid wurden in einem 50 ml Rundkolben in 10 ml D_2O gelöst und etwa 100 mg Reagenz b) zugefügt. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wurde während einer Zeitspanne von 2 Stunden durch Titration mit Lösung c) unter ständigem Rühren konstant bei 4,75 eingestellt. Nach Zugabe eines Tropfens n-Octanol tropften langsam unter Rühren 10 ml einer unmittelbar zuvor hergestellten 2 M $NaBD_4$ Lösung e) aus einer 20 ml Spritze in den Reaktionsansatz. Dabei wurde der pH-Wert der Lösung durch Titration mit Lösung d) bei 7,0 eingestellt. Nach vierstündigem Rühren wurde der Ansatz fünfmal mit je 5 ml der Lösung f) und anschließend viermal mit je 5 ml Methanol g) einrotiert.

Die Isolierung der Polysaccharide erfolgte mittels Gelfiltrationschromatographie.

Gelfiltrationsmaterial: Biogel P 2

Säule:	A = 2,0 cm ² l = 53 cm
Durchflußrate:	5 ml / h
Eluens:	H ₂ O dest.
Ausbeute:	ca. 70 % bezogen auf die eingesetzte Menge an Polysaccharid

3.13.2. Methode nach UKAI *et al.* 1977

Reagenzien:

- a) Tetrahydrofuran, über Na getrocknet
- b) LiAlD₄
- c) Chloroform

Durchführung:

Etwa 5 mg des nach 3.8. methylierten, dialysierten und lyophilisierten Polysaccharides wurden 24 Stunden bei 40° C über P₂O₅ unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde die Substanz in 3 ml Tetrahydrofuran a) (über Na getrocknet) gelöst, mit einer guten Spatelspitze (ca. 35 mg) LiAlD₄ b) versetzt und 24 Stunden auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Die Zugabe einiger Tropfen Wassers zerstörte daraufhin überschüssiges LiAlD₄. Ungelöste Anteile wurden dann abfiltriert, der Rückstand mehrmals mit Chloroform c) gewaschen und die vereinigten Filtrate am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde anschließend nach 3.9.1. hydrolysiert und daraufhin die Alditolacetate nach 3.10.2. dargestellt.

Die Identifizierung der carboxyl-reduzierten, methylierten Alditolacetate erfolgte über eine GC / MS-Analyse.

4. Pharmakologische Methoden

4.1. Chemilumineszenz-Test (mod. nach ALLEN 1981)

Geräte: Biolumat LB 9505, Fa. Berthold, München
Apple Computer II e, Software: Fa. Berthold,
Wildbad

Reagenzien:

- a) Veronalpuffer pH 7,0, mit Calcium, Magnesium, Glucose und Albumin
- b) PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium (Fa. Biochrom, Berlin)
- c) Luminollösung: 1,75 mg / ml DMSO; 1 : 50 mit H₂O verdünnt (= 0,2 mM)
- d) opsonisiertes Zymosan: 25 mg Zymosan / 10 ml physiologische Kochsalzlösung 30 min kochen, nach Abkühlen: 2 ml Zymosan mit 2 ml Einzelse- rum 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, mit 0,9 % NaCl-Lsg. waschen, in 2 ml 0,9 % NaCl aufnehmen

Granulozytenisolierung:

Heparinisiertes Vollblut (50 IE / ml) wird in 1,5 % Dextran T 500 enthal- tender physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 2 + 1 in einer Spritze gemischt, die Kanüle umgebogen, die Spritze auf dem Stempel 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, dann der leukozytenhaltige Überstand möglichst erythrozytenfrei im Verhältnis 1 + 1 in ein Zentrifugenröhrchen mit Ficoll-Lösung gespritzt und 20 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, der Rückstand zweimal mit PBS gewaschen (4° C, 10 Minuten 350 g), die Granulozyten in RPMI-Medium resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Türks-Lösung auf eine Zellzahl von 300 / µl eingestellt.

Durchführung:

30.000 Zellen werden mit 100 µl Luminol, 100 µl Substanzlösung in PBS und 660 µl Veronalpuffer bei 37° C im Photomultiplier 10 Minuten vorinkubiert, die Messung nach Zugabe von 40 µl opsonisiertem Zymosan gestartet und nach 60 Minuten abgebrochen.

Auswertung:

Zur Auswertung wird die graphische Darstellung der Chemolumineszenz-Ausbeute (cpm) gegen die Zeit herangezogen. Aus den Maxima und den Integralen läßt sich die relative prozentuale Stimulierung der Substanz im Vergleich zur Kontrollreaktion ermitteln.

4.2. Granulozytentest (mod. nach BRANDT 1967)

Reagenzien:	Heparin Novo (25.000 IE / ml)	
	Dextran T 500	Fa. Pharmacia
	Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077	Fa. Seromed
	Türks-Lösung	Fa. Merck
	RPMI-Medium	Fa. Gibco
	frische Bäckerhefe	
	EDTA = Titriplex III	Fa. Merck
	May-Grünwald-Lösung	Fa. Merck
	Giemsa-Lösung	Fa. Merck
	Immersionsöl	Fa. Merck
	PBS-Puffer, pH 7,2 - 7,3	

Hefesuspension:

0,5 g Bäckerhefe werden nach Aufschwemmen mit physiologischer Kochsalzlösung 30 Minuten im Wasserbad gekocht, abgekühlt, zweimal durch Gaze filtriert und mit physiologischer Kochsalzlösung in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Türks-Lösung auf $3 \cdot 10^7$ Zellen / ml eingestellt.

Granulozytenisolierung: siehe H 4.1.; Konzentration: 3.000 / μ l

Durchführung:

50 μ l in PBS gelöste Substanz bzw. nur PBS werden mit 280 μ l PBS, 20 μ l autologem Serum oder Plasma und 100 μ l Zellsuspension gemischt und im Wasserbad bei mittlerer Schüttelstufe 30 Minuten bei 37° C inkubiert, anschließend werden je Ansatz 50 μ l Hefesuspension zugegeben. Es wird gemischt und weitere 30 Minuten im Wasserbad belassen. Nach Abstoppen der Phagozytose mit 20 μ l 0,2 M EDTA-Lösung werden 300 μ l jedes Ansatzes auf entfettete Objektträger verteilt und 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Färbung erfolgt nach 5 bis 7 minütiger Fixierung mit Methanol mit May-Grünwald-Lösung (60 Sekunden), gepuffertem dest. Wasser (2 Minuten), Giemsa-Gebrauchslösung (3 Minuten) und Leitungswasser (2 Minuten).

Auswertung:

Ermittlung der durchschnittlich phagozytierten Hefepartikel pro Granulozyt aus 200 bis 300 Zellen = Phagozytoseindex. Jeder Objektträger sollte mindestens zweimal ausgezählt werden.

4.3. Carbon-Clearance-Test (BIOZZI *et al.* 1953)

Versuchstiere:	NMRI-Mäuse, männlich, 20 bis 25 g
Kollektivgröße:	6 bis 8 Tiere in der Substanz- und in der NaCl-Kontrollgruppe
Tuschesuspension:	schwarz, Nr. 591017, Rotringwerke, Riepe KG, Hamburg
	1,6 ml Tusche
	ad 10 ml mit 1 % Gelatine enthaltender 0,9 %iger NaCl-Lösung

Durchführung:

24 Stunden vor Testbeginn erhält das Substanzkollektiv die Untersuchungs-
lösung in einer Konzentration von 10 mg / kg Maus, die Kontrollgruppe
entsprechende Volumina physiologischer Kochsalzlösung i. p. verabreicht.
Am nächsten Tag wird jeder Maus pro 30 g Körpergewicht 0,3 ml Tusche-
suspension in die Schwanzvene injiziert. Die Blutentnahme von 25 µl aus
dem retroorbitalen Venenplexus erfolgt 3, 6, 9, 12 und 15 Minuten später
mit heparinisierten Einmalmikropipetten (Fa. Brand), die Blutproben
werden sofort in 2 ml destilliertem Wasser hämolyziert und die Extinktio-
nen bei 650 nm bestimmt.

Auswertung:

Aus dem Quotienten der Regressionskoeffizienten RC (lg E / t) von
Substanz und Kontrollgruppe ergibt sich die Aktivität der Substanz.

$$\frac{RC_{\text{Substanz}}}{RC_{\text{Kontrolle}}} = \begin{array}{ll} 1,0 - 1,2 & \text{kein Effekt} \\ 1,3 - 1,5 & \text{schwache Stimulierung} \\ > 1,5 & \text{starke Stimulierung} \end{array}$$

4.4. **Hämolytische Testsysteme zur Bestimmung der Gesamtkomplementaktivität (mod. nach KNAUS 1989)**

Detaillierte Angaben über die einzelnen Reaktionsschritte und verwendeten
Puffersysteme finden sich unter der oben genannten Literaturstelle.

4.4.1. Klassischer Weg (CP 2)

Die in Puffer gelöste Substanz wird mit konz. Serum (NHS) 30 Minuten
bei 37° C inkubiert (2 + 1). Anschließend wird die Reaktion im Eiswasser-
bad abgestoppt. 16 µl dieses Vorinkubationsansatzes werden daraufhin mit
Puffer verdünnt und 125 µl einer sensibilisierten Hammelerythrozytensus-
pension in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^8$ Z / ml zupipettiert. Nach
einer weiteren Inkubation von 25 bis 35 Minuten (je nach Testablauf), wird

die Reaktion wiederum im Eiswasserbad abgestoppt. Die Reaktionsansätze werden mit 480 g 5 Minuten bei 4° C zentrifugiert und die Überstände bei 412 nm gemessen. Als Kontrollwerte dienen ein nur aus Puffer, Serum und Erythrozyten bestehender PK-Wert (völlig unbeeinflusste Reaktion), ein aus Erythrozyten und Puffer bestehender D-Wert (Eigenhämolyse der Erythrozyten) und ein aus Erythrozyten in dest. Wasser bestehender F-Wert (Totalhämolyse). Außerdem wird die substanzeigene Zytotoxizität sowie ihre Eigenfärbung und diejenige des Serums ermittelt. Die Auswertung erfolgt wie in F.3.1. beschrieben.

4.4.2. Alternativer Weg (AP 2)

Die Durchführung ähnelt derjenigen von CP 2. Es gelangen hier jedoch Kaninchenerythrozyten in einer Konzentration von 10^8 Z / ml , modifizierte Puffersysteme und eine andere Serumverdünnung im Hauptversuch zum Einsatz. Alle in CP 2 ermittelten Kontrollwerte werden auch in AP 2 bestimmt. Die Auswertung erfolgt wie in F.3.1. beschrieben.

4.5. **Immunfixation (BECKER 1980, MAUFF 1988)**

4.5.1. Immunfixation für die Komponente C3

Geräte:

Glasplatten 12,5 x 26 cm
Gießrahmen Fa. Desaga mit Schlitzformer
Whatman Filterpapier 1 und 3
LKB Multiphor 2117
LKB Biochrom 2103 Power Supply
LKB Ultrosan 2202 Laser Densitometer
Epson Fx-85 Schreiber
Apple Computer II e, Software LKB

Reagenzien:

a) ME-Agarose	Fa. Seakem, USA
b) Calciumlactat	Fa. Merck
c) 5,5-Diethylbarbitursäure	Fa. Merck

- d) 5,5-Diethylbarbitursäure Na-Salz
- e) Anti-HuC3c (rabbit) Fa. Behringwerke AG
- f) Anti-HuC3c-IgG (rabbit) Fa. Sigma
- g) Anti-BF (goat) Fa. Biogentia, CH

Puffer:

- a) Pflugsauptpuffer:
 - Reagenz d) 87,6 g
 - Reagenz c) 13,8 g
 - Reagenz b) 5,53 g
 - dest. Wasser ad 10 l
- b) Substanzpuffer P 1:
 - PBS (150 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,2)
- c) Färbelösung: 0,7 % Serva Blau in einer Mischung aus 1000 ml Methanol, 1000 ml dest. Wasser, 100 ml Eisessig
- d) Entfärbelösung: wie Färbelösung ohne Farbstoff

Durchführung:

30 μl NHS werden mit 10 μl Substanzlösung (ca. 1 mg / 50 μl P 1, zentrifugiert 2800g, 5 min) bei 37° C 160 min inkubiert und im Eisbad abgestoppt (Kontrollen: NHS nativ, NHS + P 1, Inulin 5 mg / 100 μl P 1). Es wurden Inkubationen mit drei verschiedenen Seren durchgeführt.

Flachbettelektrophorese:

ME-Agarosegel 0,8% in Pflugsauptpuffer 1 : 1 verdünnt mit dest. Wasser (50 ml pro Platte); 10 min bei Raumtemperatur, dann 15 bis 20 Minuten bei 4° C erkalten lassen.

Auftragemenge: 3 μl Inkubationsansatz

Elektrophoresebedingungen:

40 V/cm 90 min 8° C, Anode rechts, mit Pflugsauptpuffer konzentriert.

Immunfixation:

1,0 ml Anti-HuC3c pro Platte mit einem Glasstab homogen auf dem Gel verteilen, 90 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur diffundieren lassen, dann mehrfach zwischen Filterpapier abpressen, 12 h in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur einlegen, abpressen und trocknen.

Färbung: Trockenem Gel 20 min in die Färbelösung legen, nach Sicht entfärben, trocknen.

Auswertung: Das Scannen der gefärbten Immunpräzipitate erfolgt mit einem Laser Densitometer; Berechnung des konvertierten Anteils siehe F.3.2..

4.5.2. Immunfixation für den Faktor B

siehe H.4.5.1. mit folgenden Änderungen:

Auftragemenge: 5 µl Inkubationsansatz in der Mitte des Geles auftragen

Immunfixation: 1,0 ml Anti-BF (1 : 3 verd. mit PBS) verwenden

4.6. Lymphozytentransformationstest (mod. nach DUTTON et al. 1964, KREHER 1989)

Verwendete Zellen: Menschliche Lymphozyten, über einen Ficoll Gradienten aus heparinisiertem Venenblut isoliert.

Durchführung:

10^5 Lymphozyten (200 µl) werden mit gelöster Testsubstanz (20 µl) in einer Mikrotiterplatte bei 37° C unter 5 % CO₂, 95 % Luft, 88 Stunden inkubiert (alternativ dazu auch mit Costimulierung der Zellen durch 0,8 µg Concanavalin A oder 0,48 µg Phytohämagglutinin). 18 Stunden vor Ende des

Inkubationszeitraumes erfolgt die Zugabe von ^3H -Thymidin ($0,17 \mu\text{Ci}$). Die Ermittlung der Lymphozytenproliferation wird über die Messung der Menge an eingebautem ^3H -Thymidin bestimmt. Es wurden fünffache Bestimmungen durchgeführt.

$$\text{Auswertung: \% Stimulierung} = \frac{\text{cpm}_{\text{Test}} - \text{cpm}_{\text{Kontrolle}}}{\text{cpm}_{\text{Kontrolle}}} \cdot 100$$

4.7. Hemmung des Rattenpfotenödems nach WINTER (1965)

Versuchstiere: männliche SPF-Wistar Ratten, 100 - 110 g (Savo-
Ivanovas, Kissleg)
Kontrolle: 25 Tiere
Substanz: 10 Tiere

Durchführung:

In die rechte hintere Rattenpfote werden subcutan 0,05 ml einer 1,0 %igen Carrageenanlösung eine Stunde nach der intravenösen oder intraperitonealen Gabe einer Polysaccharidlösung (1 - 10 mg / kg in 0,9 % NaCl) injiziert. Das Ödemvolumen wird innerhalb der ersten 8 Stunden nach der Carrageenanprovokation stündlich mit einem Plethysmometer (Fa. U. Basile, Mailand) gemessen. Nach einem Zeitraum von 24 Stunden erfolgt die letzte Volumenbestimmung. Die prozentuale Reduktion des Ödemvolumens wird auf eine NaCl-Kontrolle (0,9 %) bezogen. Als Referenzsubstanz dient Indometacin (10 mg / kg).

4.8. Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF- α) nach RUFF und GIFFORD (1981)

Durchführung:

$2 \cdot 10^5$ Makrophagen werden nach 24 stündiger Kultivierung in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit Antibiotika und 10 % fötalem Kälberserum, zweimal gewaschen und mit RPMI-1640 Medium ohne Serum 24 Stunden

weiterkultiviert, nachdem serielle Verdünnungen der Substanz über eine Mikrotiterplatte verteilt wurden. Anschließend werden die TNF-haltigen Überstände in zweifachen Verdünnungsreihen in eine Mikrotiterplatte pipettiert, auf die zuvor gleichmäßig 30.000 L 929 Fibroblasten je well aus einer Suspension von 300.000 Zellen pro Milliliter ausgesäht wurden. Nach Zugabe von 100 μ l eine Actinomycin D Lösung (5 μ g/ml) je well und anschließender 18 stündiger Inkubation erfolgt die mikroskopische Auswertung der Platte, wobei diejenige Substanzkonzentration 1 Unit TNF- α freisetzt, die 50 % der Fibroblasten abtötet.

4.9. Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität (WAGNER et al. 1986)

Durchführung:

Aus einer Enzympräparation (Mikrosomen aus Schafsamenblasen, NUGTEREN *et al.* 1973) werden 2 mg je Testansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgt in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (Endvolumen 2 ml). Außerdem enthält der Ansatz 1mM reduziertes Glutathion (Fa. Merck, Darmstadt), 1 mM Adrenalinbitartrat (Fa. Caesar & Lorenz, Hilden) und 0,05 mM EDTA. Der Ansatz wird bei 23° C für 5 min vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,1 μ Ci [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Arachidonsäure (Fa. New England Nuclear, Dreieich) startet die Reaktion. Es schließt sich eine 20 minütige Inkubation bei 23° C an. Durch Eiskühlung und Zusatz von Ameisensäure wird die Reaktion abgebrochen und der Ansatz mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingeeengt und der Rückstand zur HPLC-Analyse in Ethanol aufgenommen. Die Hemmwerte beziehen sich auf die im Vergleich zu den Kontrollen verminderte Konzentration an PGE₂.

I. LITERATUR

	Seite
AGGARWAL B. B., ESSALU T. E., HASS P. E., <i>Nature</i> 318 , 665 (1985)	173
AKISUE M. K., <i>Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo</i> 9 , 107 (1971).	5
AKIYAMA Y., KATO K., <i>Phytochemistry</i> 20 , 2507 (1981)	66
ALLEN R. C., in <i>Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications</i> , Eds.: DE LUCA and McELROY, pp. 63 - 73, Academic Press, New York (1981)	156, 213
ARITA H., TSUZUKI H., MORIHARA K., KAWANAMI J., <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> 76 , 861 (1974)	171
ASENSIO A., <i>J. Nat. Prod.</i> 51 , 488 (1988)	39
ASGAR S. S., <i>Pharmac. Rev.</i> 36 , 223 (1984).	22
ASPINALL G. O., McGRATH D., <i>J. Chem. Soc. (C)</i> , 2133 (1966)	39
ASPINALL G. O., KRISHNAMURTHY T. N., ROSELL K.-G., <i>Carbohydr. Res.</i> 55 , 11 (1977)	106
ASPINALL G. O., <i>Chemistry of Cell Wall Polysaccharides aus The Bio- chemistry of Plants</i> , Vol. 3, S. 473, Academic Press, New York 1980.	7
ASPINALL G. O., <i>The Polysaccharides</i> Vol 1., S. 49, Academic Press, New York, London (1982a)	23
ASPINALL G. O., <i>The Polysaccharides</i> Vol 1., S. 62, Academic Press, New York, London (1982b)	30, 98
ASPINALL G. O., FANOUS H. K., SEN A. K., <i>ACS Symposium Series</i> , No 214, Unconventional Sources of Dietary Fiber, Ed. IVAN FURDA, Am. Chem. Soc. (1983)	39
ATKINS E. D. T., PARKER K. D., PRESTON R. D., <i>Proc. Roy. Soc. B.</i> 173 , 209 (1969)	144
BACIC A., CHURMS S. C., STEPHEN A. M., COHEN P. B., FINCHER G. B., <i>Carbohydr. Res.</i> 162 , 85 (1987)	107
BASSIEUX D., GAGNAIRE D. Y., VIGNON M., <i>Carbohydr. Res.</i> 56 , 19 (1977).	82, 83
BAUER R., KHAN I. A., WAGNER H., <i>Dtsch. Apoth. Ztg.</i> 127 , 1325 (1987)	48
BAUER W., TALMADGE K. W., KEEGSTRA K., ALBERSHEIM P., <i>Plant Physiol.</i> 51 , 174 (1973)	65, 106
BECKER B., Dissertation Med. Fakultät I der Universität Köln (1980)	164, 217
BERGER F., <i>Handbuch der Drogenkunde</i> , Wilhelm Maudrich Verlag, Wien (1960)	42

- BEUTLER B., MAHONEY J., LE TRANG N., PEKALA P., CERAMI A., *J. exp. Med.* **161**, 984 (1985a) 171
- BEUTLER B., GREENWALD D., HULMES J. D., CHANG M., PAN Y.-C. E.,
MATHISON J., ULEVITCH R., CERAMI A., *Nature* **316**, 552 (1985b). 173
- BIOZZI G., BENACERRAF B., HALPERN B. N., *Brit. J. Exp. Pathol.* **34**, 441 (1953) 158, 215
- BITTER T., MUIR H. M., *Anal. Biochem.* **4**, 330 (1962)
. 7, 8, 11, 14, 18, 26, 50, 51, 55, 69, 76, 86, 97, 112, 123, 133, 190
- BLAKE J. D., MURPHY P. J., RICHARDS G. N., *Carbohydr. Res.* **16**, 49 (1971) 196
- BLAKE J. D., RICHARDS G. N., *Carbohydr. Res.* **8**, 275 (1968) 54
- BLAKE J. D., RICHARDS G. N., *Carbohydr. Res.* **14**, 375 (1970). 54
- BLAKENEY A. B., HARRIS P. J., HENRY R. J., STONE B. A., *Carbohydr. Res.* **113**, 291 (1983) 8, 210
- BOCK K., PEDERSEN C., *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **41**, 27 (1983) 59, 61
- BOHLMANN F., BURKHARDT T., ZDERO C., *Naturally Occurring Acetylenes*,
Academic Press, London (1973). 5
- BONADEO I., BOTAZZI G., LAVAZZA M., *Rif. Ital. Essenze, Profumi, Piante officin.*, *Aromi, Saponi, Cosmetici, Aerosol* **53**, 281 (1971) 108
- BRANDT L., *Scand. J. Haematol. Suppl.* **2** (1967) 157, 214
- BREITMAIER E., BAUER G., ¹³C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1977) 93
- BREITMAIER E., VOELTER W., *Tetrahedron* **29**, 227 (1973) 95, 96, 128, 130, 131
- BRUNNER H., *Dtsch. Apoth.-Zeit.* **109**, 1723 (1969) 45, 46
- BUCHALA A. J., MEIER H., *Carbohydr. Res.* **89**, 137 (1981). 30
- BURSTEIN S., VARANELLI C., SLADE L. T., *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1053 (1974) . . 176
- BUSCHMANN H., *Fortschr. Veterinärmed.* **20**, 98 (1974) 47
- CALDES G., PRESCOTT B., THOMAS II C. A., BAKER P. J.,
J. Gen. Appl. Microbiol. **27**, 157 (1981). 109, 196
- CAPEK P., TOMAN R., KORDOSOVA A., ROSIK J., *Carbohydr. Res.* **117**, 133 (1983) 96
- CARSWELL E. A., OLD L. J., KASSEL R. L., GREEN S., FIORE N., WILLIAMSON B.,
Proceed. of the Nat. Acad. of Sciences of the U S A **72**, 3666 (1975) 171
- CHAMBAT G., JOSELEAU J.-P., *Carbohydr. Res.* **85**, C10 - C12 (1980) 64
- CLARKE A. E., ANDERSON R. L., STONE B. A., *Phytochemistry* **18**, 521 (1979) 107, 145
- COLLINS G. J., BRADBURY H. J., *Carbohydr. Res.* **93**, 136 (1981a) 19

- COLLINS J. G., BRADBURY J. H., TRIFONOFF E., MESSER M., *Carbohydr. Res.* **92**, 136 (1981b) 93, 95, 104, 128, 130, 140
- CORDINGLEY F. T., BIANCHI A., HOFFBRAND A. V., REITTIE J. E.,
HESLOP H. E., VYAKARNAM A., TURNER M., MEAGER A.,
BRENNER M. K., *Lancet*, im Druck (1988) 173
- DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 9. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart;
Govi-Verlag GmbH, Frankfurt (1986) 17, 42, 44, 48, 54, 75, 85, 150, 184
- DI ROSA M., GIROUD J. P., WILLOUGHBY D. A., *J. Path.* **104**, 15 (1971) 171
- DIAS DA SILVA R. A., *Pharmacopeia Dos Estados Unidos Do Brasil*,
Companhia Editora Nacional, Sao Paulo (1929) 4
- DINARELLO C. A., CANNON J. G., WOLFF S. M., BERNHEIM H. A., BEUTLER B.,
CERAMI A., FIGARI I. S., PALLADINO M. A. Jr., O'CONNOR J. V.,
J. Exp. Med. **163**, 1433 (1986) 150, 172
- DÖRING P., *Arzneipflanzen-Umschau* **1**, 320 (1943) 44
- DORMAN D. E., ROBERTS J. D., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4463 (1971) 80
- DUTTON R. W., EADY J. D., *Immunology* **7**, 40 (1964) 165, 219
- EBERT M., MERFORT I., WILLUHN G., *Phytochemistry* **27**, 3849 (1988) 46
- EBY R., SCHUERCH C., *Carbohydr. Res.* **92**, 149 (1981) 82, 83
- EDA S., MIYABE K., AKIYAMA Y., OHNISHI A., KATO K., *Carbohydr. Res.* **158**, 205 (1986) 39
- EVSTRATOVA R. I., SHEICHENKO V. I., RYBALKO K. S., BAN'KOVSKII A. I.,
Khim.-Farm. Zh. **3**, 39 (1969) 45
- FABER K., *Die Pharmazie* **8**, 179 (1953) 41-43
- FENNER H., *Dtsch. Apoth. Ztg.* **124**, 1257 (1984) 176
- FERRARO G. E., NORBEDO C., COUSSIO J. D., *Phytochemistry* **20**, 2053 (1981) 5
- FINCHER G. B., STONE B. A., CLARKE A. E., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34**, 47 (1983) 107
- FLORY P. J., *Principles of Polymer Chemistry*,
Cornell University Press, Ithaca, N. Y. (1953) 74
- FRIEBOLIN H., *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*,
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1988) 21, 149
- FUJIMOTO S., KIKUMOTO S., KANEUCHI T., *Taito Kenkyusho Hokoku* **22**, 77 (1964) 65
- GAMMON D. W., CHURMS S. C., STEPHEN A. M., *Carbohydr. Res.* **151**, 135 (1986) 107
- GAO Q.-P., KIYOHARA H., CYONG J.-C., YAMADA H., *Planta Med.* **55**, 9 (1989) 163
- GARCIA-BARRIGA H., *Flora Medicinal de Colombia Vol.2/3*,
Universidad Nacional, Bogota (1975) 4

- GAST J. C., ATALLA R. H., McKELVEY R. D., *Carbohydr. Res.* **84**, 137 (1980) . . . 82, 83
- GOHLA S. H., HAUBECK H.-D., NETH R. D., *Leukemia* **2**, 528 (1988) 167
- GONZALES M., LOMBARDO A., *Rev. Farm.* **88**, 297 (1946) 4
- GORIN P. A. J., MAZUREK M., *Can. J. Chem.*
53, 1212 (1975) 95, 96, 104, 128, 130, 131, 140
- GRUBISIC Z., REMPP P., BENOIT H., *J. Polym. Sci. B.* **5**, 753 (1967) 74
- HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart,
 Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 4. Nachtrag (1985) 44
- HAHLBROCK K., GRISEBACH H., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30**, 105 (1979) 65
- HAKOMORI S. I., *J. Biochem. (Tokyo)*
55, 205 (1964) 23, 26, 36, 55, 77, 88, 98, 124, 134, 208
- HALL I.-H., LEE K.-H., STARNES C. O., SUMIDA Y., WU R. Y., WADDEL T. G.,
 COCHRAN J. W., GERHARD K. G., *J. Pharm. Sci.* **66**, 537 (1979) 47
- HAMPP N., Dissertation Universität München (1986) 207
- HÄNSEL R., OHLENDORF D., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **304**, 893 (1971) 5
- HARA C., KIHOT T., TANAKA Y., UKAI S., *Carbohydr. Res.* **110**, 77 (1982) 171
- HERRMANN H. D., WILLUHN G., HAUSEN B. M., *Planta Med.* **34**, 299 (1978). 45
- HIRSCHMANN G. S., *Rev. Latinoamer. Quim.* **15**, 134 (1984) 4, 5
- HOLUB M., SAMEK Z., POPLAWSKI J., *Phytochemistry* **14**, 1659 (1975) 46
- HOLUB M., POPLAWSKI J., SEDMERA P., HEROUT V., *Collect. Czech. Chem.*
Commun. **42**, 151 (1977) 46
- HOPPE H. A., *Drogenkunde*, Bd. 1, S. 114, Walter de Gruyter Verlag, Berlin (1975). . 41
- INOUE S., MIGUWAKI M., *Anal. Biochem.* **65**, 164 (1975) 26
- ISHIZAKA S., HASUMA T., OTANI S., MORISAWA S., *J. Immunol.* **125**, 2232 (1980). 167
- ISSEKUTZ A. C., *J. Immunol. Methods* **61**, 275 (1983) 152, 175, 206
- JANSSON P. E., KENNE L., LIEGREN H., LINDBERG B., LÖNNGREN J., *Chem.*
Commun. (Stockholm Univ.) **8** (1976) 23, 26, 36, 55, 77, 88, 98, 124, 134
- JAQUES L. W., MACASKILL J. B., WELTNER, Jr., W., *J. Phys. Chem.*
83, 1412 (1979) 58, 62
- JELINEK D. F., LIPSKY P. E., *J. of Immunol.* **139**, 2970 (1987) 173
- JONES E. Y., STUART D. I., WALKER N. P. C., *Nature* **338**, 225 (1989) 171
- JORDAN E., WAGNER H., *Oncology* **43**, Suppl. 1, 8 (1986) 96
- JOSELEAU J. P., CHAMBAT G., VIGNON M., BARNAUD F., *Carbohydr. Res.*
58, 165 (1975) 96
- KABAT E. A., MAYER M. M., *Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry*,
 Ed. 2, S. 133, Publ. CH. C. THOMAS, Springfield, USA (1961) 160

- KAKAC B., VEJDELEK Z. J., in: *Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen*, Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim (1974) 76
- KALOGA M., HÄNSEL R., CYBULSKI E. M., *Planta Med.* **48**, 103 (1983) 5
- KARACSONYI S., KOVACIK V., ALFÖLDI J., KUBACKOVA M., *Carbohydr. Res.* **134**, 265 (1984) 102
- KATING H., RINN W., WILLUHN G., *Planta Med.* **18**, 130 (1970) 45
- KATO M., TAKEDA T., OGIHARA Y., SHIMIZU M., NOMURA T., TOMITA Y., *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3675 (1985) 171
- KATO Y., MATSUDA K., *Plant Cell Physiol.* **17**, 1185 (1976) 106
- KATO Y., ASANO N., MATSUDA K., *Plant Cell Physiol.* **18**, 821 (1977) 106
- KEEGSTRA K., TALMADGE K. W., BAUER W., ALBERSHEIM P., *Plant Physiol.* **51**, 188 (1973) 65
- KEENAN M. H. J., BELTON P. S., MATTHEW J. A., HOWSON S. J., *Carbohydr. Res.* **138**, 168 (1985) 58, 62
- KIHO T., SAKAI M., UKAI S., HARA C., TANAKA Y., *Carbohydr. Res.* **142**, 344 (1985) 171
- KIKUMOTO S., SHIGA T., *Taito Kenkyusho Hokoku* **23**, 77 (1965) 65
- KIYOHARA H., CYONG J.-C., YAMADA H., *Carbohydr. Res.* **182**, 259 (1988) 163
- KIYOHARA H., YAMADA H., CYONG J.-C., OTSUKA Y., *J. Pharmacobio-Dyn.* **9**, 339 (1986) 73
- KLEBANOFF S. J., VADAS M. A., HARLAN J. M., SPARKS J. H., GAMBLE J. R., AGOSTI J. M., WALTERSDORPH A. M., *J. of Immunol.* **136**, 4220 (1986) 172
- KNAUS U., Dissertation Universität München (1989) 161, 167, 216
- KOMATSU N., OKUBO S., KIKUMOTO S., KIMURA K., SAITO G., SAKAI S., GANN **60**, 137 (1969) 65
- KOVAC P., SOKOŁOSKI E. A., GLAUDEMANS C. P. J., *Carbohydr. Res.* **128**, 101 (1984) 128, 130
- KREHER B., Dissertation Universität München 1989, in Vorbereitung 165, 219
- KULL F. C. Jr., JACOBS S., CUATRECASAS P., *Proceed. of the Nat. Acad. of Sciences of the U S A* **82**, 5756 (1985) 172, 173
- KUROKAWA Y., TAKEDA T., OGIHARA Y., SHIMIZU M., TAKAI M., *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2654 (1988) 93, 95
- LEE K. H., IBUKA T., WU R.-Y., GEISSMAN T. A., *Phytochemistry* **16**, 1177 (1977) 47
- LEE K. H., IBUKA T., SIMS D., MURAOKA O., KIWOKAWA H., HALL L. H., KIM H. L., *J. Med. Chem.* **24**, 924 (1981) 47
- LENK W., *Z. Phytother.* **10**, 49 (1989) 154

LINDSMAIER E. M., SKOOG F., <i>Plant Physiol.</i> 18 , 100 (1965)	67
LIST P. H., FRIEBEL B., <i>Arzneim.-Forsch./Drug Res.</i> 24 , 148 (1974)	45
LOHMANN-MATTHES M.-L., WAGNER H., <i>Z. Phytother.</i> 10 , 52 (1989)	108
LOMBARD A., ROSSETTI V., BUFFA M., CONGIU G., <i>Carbohydr. Res.</i> 96 , 131 (1981) 46	
LOWRY O. H., <i>J. Biol. Chem.</i> 193 , 265 (1951)	
. 7, 8, 11, 14, 18, 50, 51, 54, 55, 69, 76, 86, 97, 112, 123, 133, 192	
MAGUIRE B., <i>Brittonia</i> 4 , 386 (1943)	41
MARCHESSAULT R. H., DESLANDES Y., OGAWA K., SUNDARARAJAN P. R., <i>Can. J. Chem.</i> 55 , 300 (1977)	145
MARCHISHIN S. M., KOMISSARENKO N. F., <i>Khim. Priro. Soedin.</i> (5), 662 (1981) 45, 46	
MASSIOT P., ROUAU X., THIBAULT J.-F., <i>Carbohydr. Res.</i> 172 , 229 (1988)	26
MAUFF, persönliche Mitteilung (1988)	164, 217
McNEIL M., DARVILL A. G., FRY S. T. C., ALBERSHEIM P., <i>Ann. Rev. Biochem.</i> 53 , 625 (1984)	63, 73
MERFORT I., <i>Planta Med.</i> 50 , 107 (1984)	46
MERFORT I., <i>Planta Med.</i> 51 , 136 (1985)	46
MERFORT I., WENDISCH D., <i>Planta Med.</i> 53 , 434 (1987).	46
MERFORT I., WENDISCH D., <i>Planta Med.</i> 54 , 247 (1988).	46
MICHEL F., MERCKLEIN L., REY R., CRASTES DE PAULET A., in: <i>Flavonoids and Bioflavonoids</i> , S. 389 ff, Eds.: FARKAS L., GABOR M., KALLAY F., Budapest (1985)	176
MISAWA M., <i>Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application</i> , Eds.: BARZ W., REINHARD E., ZENK M. H., S. 17, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977)	65
MORI H., MIHARA M., TESHIMA K., UESUGI U., XU Q., SAKAMOTO O., KODA A., <i>Int. J. Immunopharmac.</i> 9 , 881 (1987)	175
MORTON J. F., <i>Morris Arboretum Bull.</i> 25 , 24 (1974)	4
MORTON J. F., <i>Q. J. Crude Drug Res.</i> 13 , 97 (1975)	4
MURALIKRISHNA G., SALIMATH P. V., THARANATHAN R. N., <i>Carbohydr. Res.</i> 161 , 265 (1987)	39
McEWAN T., McINNIS A. G., SMITH D. G., <i>Carbohydr. Res.</i> 104 , 161 (1982)	82, 83
NELSON C. R., GRATZL J. S., <i>Carbohydr. Res.</i> 60 , 267 (1978)	54
NORISUYE T., YANAKI T., FUJITA H., <i>J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.</i> 18 , 547 (1980)	144
NOTHNAGEL E. A., Mc NEIL M., ALBERSHEIM P., DELL A., <i>Plant Physiol.</i> 71 , 916 (1983)	63

- NUGTEREN D. E., HAZELHOF E., *Biochem. Biophys. Acta* **326**, 448 (1973). 221
- O'NEILL M. A., SELVENDRAN R. R., *Carbohydr. Res.* **111**, 239 (1983). 106
- O'NEILL M. A., SELVENDRAN R. R., *Carbohydr. Res.* **79**, 115 (1980). 10
- OBAYASHI T., TAMURA H., TANAKA S., OHKI M., TAKAHASHI S., KAWAI T.,
Infect. Immun. **53**, 294 (1986). 151
- OLD L. J., *Spektrum d. Wissenschaft*, Juli, **42** (1988). 173
- ONOZAKI K., URAWA H., TAMATANI T., IWAMURA Y., HASHIMOTO T., BABA T.,
 SUZUKI H., YAMADA M., YAMAMOTO S., OPPENHEIM J. J.,
 MATSUSHIMA K., *J. Immunol.* **140**, 112 (1988). 173
- PALACIOS R., SUGAWARA I., FERNANDEZ C., *J. Immunol.* **128**, 621 (1982). 167
- PALLADINO M. A., SHALABY M. F., KRAMER S. M., FERRAILOLO B. L., BAUGHMAN
 R. A., DELEO A. B., CRASE D., MARAFINO B., AGGARWAL B. B., FIGARI
 I. S., LIGGIT D., PATTON J. S., *J. Immunol.* **138**, 4023 (1987). 173
- PANGBURN M. K., *Fed. Proceed.* **42**, 139 (1983). 160
- PETRAKOVA E., KOVAC P., *Chem. Zvesti* **35**, 551 (1981). 82, 83
- PLATTS-MILLS T. A. E., ISHIZAKA K., *J. Immunol.* **113**, 348 (1974). 160
- POPLAWSKI J., HOLUB M., SAMEK Z., HEROUT V.,
Collect. Czech Chem. Commun., **36**, 2189 (1971). 45
- PROKSCH A., WAGNER H., *Phytochemistry* **26**, 1989 (1987). 108
- REES D. A., MORRIS E. R., THOM D., MADDEN J. K., in:
The Polysaccharides Vol. 1, S. 195 ff, Ed.: ASPINALL G. O.,
 Academic Press, New York (1982). 58
- REES D. A., SCOTT W. E., *J. Chem. Soc. B* 469 (1971). 144
- RICCIARDI A. I. A., CASSANO A. E., BURGOS J. L., *C.A.* **59**, 378 (1963). 5
- RING S. G., SELVENDRAN R. R., *Phytochemistry* **17**, 745 (1978). 26
- ROCHE SILVA M., CAVALCANTI R. Q., REIS M. L., *Biochem. Pharmacol.*
18, 1285 (1969). 168
- ROMBOUTS F. M., THIBAUT J.-F., *Carbohydr. Res.* **154**, 189 (1986). 39, 61, 63
- ROTE LISTE, Editio Cantor AG, Aulendorf (1989). 4, 44
- RÜCKER G., *Sci. Pharm.* **38**, 255 (1970). 45, 46
- RUFF M. R., GIFFORD G. E., *Infect. Immun.* **31**, 380 (1981). 173, 220
- RUHLAND W., ASHBY E., BONNER J., GEIGER-HUBER M., JAMES W. O., LANG A.,
 MÜLLER D., STALFELT M. G., in: "*Handbuch der Pflanzenphysiologie*",
 Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958). 22
- SAGGESE D., *Medicinal Herbs of Argentina*, 10th ed. Antognazzi & Co.,
 Rosario (1959). 4

SAITO H., MISAKI A., HARADA T., <i>Agric. Biol. Chem.</i> 32 , 1261 (1968)	163
SANER A., LEUPIN K., <i>Pharm. Acta Helv.</i> 41 , 431 (1966)	45
SASAKI T., TAKASUKA N., <i>Carbohydr. Res.</i> 47 , 99 (1976)	163
SAULNIER L., BRILLOUET J.-M., Abstract-Buch des XIV th Int. Carbohydr. Symposium, Stockholm, 14. - 19. August 1988	107
SAULNIER L., BRILLOUET J.-M., JOSELEAU J.-P., <i>Carbohydr. Res.</i> 182 , 63 (1988)	95, 96, 102, 104, 128, 130, 131, 140
SCHEER R., <i>Pharm. Unserer Zeit</i> 13 , 137 (1984).	150, 151
SHALABY M. R., AGGARWAL B. B., RINDERKNECHT E., SVEDERSKY L. P., FINKLE B. S., PALLADINO M. A. Jr., <i>J. Immunol.</i> 135 , 2069 (1985)	172
SHASHKOV A. S., CHIZHOV O. S., <i>Soviet J. of Bioorg. Chem.</i> 2 , 311 (1976)	59
SHASHKOV A. S., ARBATSKY N. P., DEREVITSKAYA V. A., KOCHETKOV N. K., <i>Carbohydr. Res.</i> 72 , 218 (1979)	82, 83
SHIMIZU N., TOMODA M., <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33 , 5539 (1985)	58, 62
SIDDIQUI R., WOOD P. J., <i>Carbohydr. Res.</i> 36 , 35 (1974)	196
SIMÕES C. M. O., SCHENKEL E. P., BAUER L., LANGELOH A., <i>J. Ethnopharmacol.</i> 22 , 281 (1988)	4, 6, 168
SOUZA GROTTA A., <i>Sci. Pharm.</i> 32 , 172 (1964).	3
SPIRO R. G., in: <i>Methods in Enzymology</i> 8 , 3 (1966), Eds.: NEUFELD E. F., GINSBURG V., Academic Press, New York	207
SRIVASTAVA V. K., SONDHEIMER S. J., SCHUERCH C., <i>Carbohydr. Res.</i> 86 , 203 (1980)	93, 95, 102, 104
STEPHEN A. M., Other Plant Polysaccharides, in <i>The Polysaccharides</i> Vol. 2, S. 157, Ed.: ASPINALL G. O., Academic Press, New York, London (1983a)	26
STEPHEN A. M., Other Plant Polysaccharides, in <i>The Polysaccharides</i> Vol. 2, S. 158, Ed.: ASPINALL G. O., Academic Press, New York, London (1983b)	39
STEPHEN A. M., Other Plant Polysaccharides, in: <i>The Polysaccharides</i> Vol. 2, S. 155, Ed.: ASPINALL G. O., Academic Press, New York, London (1983c)	55, 140
STEPHEN A. M., Other Plant Polysaccharides, in: <i>The Polysaccharides</i> Vol. 2, S. 122, Ed.: ASPINALL G. O., Academic Press, New York, London (1983d)	104
STEVENS B. J. H., SELVENDRAN R. R., <i>Carbohydr. Res.</i> 128 , 321 (1984)	39

- STRASBURGER E., NOLL F., SCHENCK H., SCHIMPER A. F. W.,
"Lehrbuch der Botanik", neubearbeitet von DENFFER D. v.,
 EHRENDORFER F., MÄGDEFRAU K., ZIEGLER H.,
 Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1978) 2
- STUPPNER H., Dissertation Universität München (1985) 116, 122, 133
- STUPPNER H., persönliche Mitteilung (1989) 123, 142
- SUGAWARA I., ISHIZAKA S., *Cell Immunol.* **74**, 162 (1982) 167
- SUN T., STAGIAS J., *Clin. Chem.* **32**, 2170 (1986) 164
- SWEET D. P., SHAPIRO R., ALBERSHEIM P., *Carbohydr. Res.* **40**, 217 (1975)
 23, 27, 31, 34, 37, 58, 78, 90, 99, 101, 126, 135, 136
- SWIATEK L., GORA J., *Herba Pol.* **24**, 187 (1978) 45
- TALMADGE K. W., KEEGSTRA K., BAUER W., ALBERSHEIM P., *Plant Physiol.*
51, 158 (1973) 65
- TAYLOR R. L., CONRAD H. E., *Biochem.* **11**, 1383 (1972) 26, 55, 211
- TOMODA M., SATOH N., SHIMADA K., *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 824 (1980) 26
- TSUMURAYA Y., HASHIMOTO Y., YAMAMOTO S., *Carbohydr. Res.* **161**, 113 (1987) 107
- TUBARO A., Publikation in Vorbereitung (1989) 171
- UKAI S., HIROSE K., KIHIO T., HARA C., *Chem. Pharm. Bull.*
25, 338 (1977) 99, 136, 212
- UKAI S., KIHIO T., HARA C., KURUMA I., TANAKA Y., *J. Pharmacobiodyn.*
6, 983 (1983) 171
- VANHAELN M., *Planta Med.* **23**, 308 (1973) 45
- VILCEK J., PALOMBELLA V. J., HENRIKSEN-DeSTEFANO I., SWENSON C.,
 FEINMAN R., HIRAI M., TSUJIMOTO M., *J. Exp. Med.* **163**, 632 (1986) . . 173
- VOLLMAR A., SCHÄFER W., WAGNER H., *Phytochemistry* **25**, 377 (1986) . . 7, 39, 40
- VORAGEN A. G. J., SCHOLS H. A., PILNIK W., *Food Hydrocolloids* **1**, 65 (1986) . . 19
- VORLAENDER K.-O., *"Immunologie"*, S.132, Georg Thieme Verlag,
 Stuttgart, New York (1983) 156
- WAGNER H., PROKSCH A., *Z. Phytother.* **5**, 166 (1981a) 108
- WAGNER H., FLACHSBARTH H., VOGEL G., *Planta Med.* **41**, 244 (1981b) 171
- WAGNER H., BLADT S., ZGAINSKI E. M., *Drogenanalyse*, Springer Verlag,
 Berlin-Heidelberg-New York (1983) 48
- WAGNER H., PROKSCH A., RIESS-MAURER I., VOLLMAR A., ODENTHAL S.,
 STUPPNER H., JURCIC K., LE TURDU M., FANG J. N.,
Arzneim.-Forsch./Drug Res. **35**, 1069 (1985) 6, 47, 155
- WAGNER H., WIERER M., BAUER R., *Planta Med.* **52**, 184 (1986). 221

WAGNER H., PROKSCH A., <i>Phytochemistry</i> 26 , 1989 (1987)	7
WAGNER H., WIERER M., <i>Z. Phytother.</i> 9 , 11 (1988a)	46
WAGNER H., STUPPNER H., SCHÄFER W., ZENK M. H., <i>Phytochemistry</i> 27 , 119 (1988b)	66, 106, 170, 175
WAGNER H., JORDAN E., <i>Phytochemistry</i> 27 , 2511 (1988c)	163
WARDI A. H., ALLEN W. S., VARMA R., <i>Anal. Biochem.</i> 57 , 268 (1974)	7, 8, 191
WATANABE T., TAKAHASHI K., MATSUDA K., <i>Agric. Biol. Chem.</i> 44 , 791 (1980)	106
WEHRHAHN H. R., <i>Die Gartenstauden</i> Bd. 2, Berlin (1931)	44
WEIL I., REUTER H. D., <i>Z. Phytother.</i> 9 , 26 (1988)	47
WHITE C. A., KENNEDY J. F., LOMBARD A., ROSSETTI V., <i>Br. Polym. J.</i> 17 , 327 (1985)	46
WILDER B. M., ALBERSHEIM P., <i>Plant Physiol.</i> 51 , 889 (1973)	65, 106
WILLIAMS D. H., Fleming I., <i>Strukturaufklärung in der Organischen Chemie</i> , G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1985).	61
WILLIAMSON B. D., CARSWELL E. A., RUBIN B. Y., PRENDERGAST J. S., OLD L. J., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 80 , 5397 (1983)	173
WILLUHN G., <i>Planta Med.</i> 21 , 221 (1972)	45
WILLUHN G., <i>Pharm. Unserer Zeit</i> 10 , 1 (1981)	47
WILLUHN G., RÖTTGER P. M., QUACK W., <i>Pharm. Ztg.</i> 127 , 2183 (1982)	47
WILLUHN G., RÖTTGER P.-M., MATTHIESEN U., <i>Planta Med.</i> 49 , 226 (1983a)	45
WILLUHN G., KRESKEN J., MERFORT I., <i>Dtsch. Apoth. Ztg.</i> 123 , 2431 (1983b)	48
WILLUHN G., <i>Z. Phytother.</i> 5 , 765 (1984)	46
WILLUHN G., RÖTTGER P.-M., WENDISCH D., <i>Planta Med.</i> 50 , 35 (1984)	45
WINTER C. A., in: <i>Non-steroidal Antiinflammatory Drugs</i> , Eds.: GARATTINI S., DUKES M. N. G., p.170, Excerpta Medica, Amsterdam (1965)	220
WOOD P. J., SIDDIQUI I. R., <i>Anal. Biochem.</i> 39 , 418 (1971).	19, 63, 192
YAMADA H., NAGAI T., CYONG J.-C., OTSUKA Y., TOMODA M., SHIMIZU N., SHIMADA K., <i>Carbohydr. Res.</i> 144 , 101 (1985)	163
YAMADA H., NAGAI T., CYONG J.-C., OTSUKA Y., TOMODA M., SHIMIZU N., GONDA R., <i>Carbohydr. Res.</i> 156 , 137 (1986)	163
YAMADA H., KIOHARA H., OTSUKA Y., <i>Carbohydr. Res.</i> 170 , 181 (1987).	163
YAMADA H., RA K.-S., KIOHARA H., CYONG J.-C., YANG H. C., OTSUKA Y., <i>Phytochemistry</i> 27 , 3163 (1988)	163
YAMAOKA T., SATO S., <i>Bot. Mag.</i> 90 , 153 (1977)	63
YOKOTA S., GEPPERT TH. D., LIPSKY P. E., <i>J. Immunol.</i> 140 , 531 (1988)	177

-
- ZENK M. H., *Frontiers of Plant Tissue Culture*, Ed.: TORPE T. A.,
Proceed. of the 4th Intern. Congr. of Plant and Cell Culture, S 1 (1978) . . . 65
- ZENK M. H., *Pharmazie heute* 3, 131 (1982). 65
- ZUCALI J. R., ELFENBEIN G. J., BARTH K. C., DINARELLI C. A.,
J. of Clin. Investig. 80, 772 (1987) 173

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Wagner für sein großes Interesse an meiner Arbeit, für die stets großzügige Förderung, das jederzeit in mich gesetzte große Vertrauen und die Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank:

Herrn Professor Dr. M. Zenk und seinen Mitarbeitern, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die Herstellung der Arnika-Zellkulturen.

Herrn Professor Dr. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die rasche Aufnahme zahlreicher GC-MS-Analysen und für die sehr freundlichen und hilfreichen Diskussionen.

Frau Professor Dr. M.-L. Lohmann-Matthes, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover, für die Durchführung der TNF-Tests und die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. B. Brümmer und Herrn Dr. K. Deppe der Fa. Diversa, Hamburg, für die engagierte und nette Zusammenarbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. G. Wegener, Institut für Holzforschung der Universität München, für die Ausführung der quantitativen Zuckeranalysen.

Herrn Dr. O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die Aufnahme zahlreicher GC-MS- und ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn R. Stadler, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, Lehrstuhl Prof. Zenk, für die Aufnahme der 90 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer posthum und Frau Dr. K. Rodewald, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Danksagung

Herrn Dr. A. Neszmelyi, Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest, für die Durchführung eines APT-Experimentes.

Frau Dr. K. Jurcic für die Zusammenarbeit beim Carbon-Clearance-Test, sowie ihren Assistentinnen R. Mayer und S. Vollmer für die sehr sorgfältige und ausgezeichnete Durchführung pharmakologischer Untersuchungen.

Frau Dr. U. Knaus für die Durchführung der Komplement-Untersuchungen, die exzellente und sehr engagierte Zusammenarbeit, ihre außerordentliche Diskussionsbereitschaft und die daraus resultierenden zahlreichen Anregungen.

Herrn B. Kreher und Frau I. Gügel für die Durchführung der Lymphozytentransformationstests. Speziell danken möchte ich Herrn Kreher für seine große Kollegialität und sehr freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau B. Kreil für die vielen wertvollen Ratschläge und die große Hilfsbereitschaft, die sich nicht nur auf den Rahmen dieser Arbeit beschränkten.

Frau C. Schöllhorn für ihre tatkräftige Unterstützung bei mehreren Untersuchungen.

Meinen Freunden und Kollegen Dr. H. Stuppner, Dr. E. Jordan, Dr. R. Bauer, Dr. K. Seegert und Dr. S. Bladt für ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Anregungen und ihre Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem all Denen, die während meines Aufenthaltes am Institut durch ihr Verhalten dazu beitrugen, daß diese Zeit in meinem Leben einen besonderen Stellenwert einnehmen wird.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meinem Bruder Markus für das Anfertigen der Zeichnungen sowie meinem Bruder Helge für die Unterstützung auf dem Gebiet der Informatik.

LEBENS LAUF

Jörg Puhlmann

geboren am 25. Juli 1958 in Mindelheim

Eltern:	Wolfgang Puhlmann, Justizamtmann Margit Puhlmann, Kauffrau
Schul Ausbildung:	1964 – 1968 Peter Dörfler Volksschule, Kaufbeuren 1968 – 1977 Staatliches Gymnasium, Kaufbeuren Abitur Juni 1977
Grundwehrdienst:	1977 – 1978
Berufliche Tätigkeit:	1978 – 1980 im elterlichen Betrieb
Studium der Pharmazie:	WS 1980/81 – WS 1983/84 an der Ludwig-Maximilians-Universität, München 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung April 1984
Pharmaziepraktikum:	Juni 1984 – Mai 1985 Sudeten-Apotheke, Kaufbeuren-Neugablonz
Approbation:	Juli 1985
Wissenschaftl. Tätigkeit:	August 1985 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München

